

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSTGRADO

Variación genética intraespecífica de *Echinococcus granulosus* en la sierra central y sur del Perú

TESIS

para optar el grado académico de Magíster en Microbiología

AUTOR

Juana del Carmen Calderón Sánchez

ASESOR

Armando González Zariquiey

Lenin Maturrano Hernández

Lima – Perú

2008

DEDICATORIA:

A Dios, a quien llevo siempre presente.

A mi amada madre: Juanita, porque ahí donde esta, estoy segura que ahora tiene una sonrisa y porque su recuerdo me ayudo a seguir en muchos momentos de este trabajo. Eternamente y con todo el cariño, muchas gracias.

A mi padre Manuel, a quien admiro, por demostrarme que con constancia y esfuerzo uno puede llegar a donde se proponga.

A mis hermanos, Maritza, Luis, Percy y Manuel, por toda su ayuda, por hacer que creyese en mi misma y por apoyarme constantemente dándome voz de aliento para seguir adelante en cada uno de mis tropiezos.

A mis sobrinas Katthy, Sthephany y Alisson, por ser la fuerza que me impulsa en el logro de mis mas grandes anhelos.

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Armando González Zariquiey por su apoyo y valiosa colaboración en la culminación del presente, sin el cual hubiera sido difícil concluir el presente trabajo.

Al Dr. Lenin Maturrano Hernández por todo su apoyo incondicional, por demostrarme siempre su disposición y porque desde el principio y hasta el final me respaldo.

Al Dr. Cesar Gavidia Chucan, Dra. Manuela Verastegui Pimentel y Dr. Roberth Gilman, por permitirme el logro de esta meta, y que sin duda quedan plasmadas en este documento.

A la Dra. Rina Ramírez y Blgo. Pedro Romero, por haber compartido conmigo sus conocimientos, sin los cuales hubiera sido difícil concluir el presente trabajo

A Iskra, Milagros, Angélica y en especial a Yanina Arana, quisiera agradecerles la sincera amistad, comprensión y apoyo que me ha ayudado a recuperar el ánimo, hacerme fuerte en los momentos de apuro y que ha sido imprescindible para mantener la ilusión de terminar esta tesis.

A mis compañeros de Trabajo de La Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y al Laboratorio de Enfermedades infecciosas y Tropicales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia por compartir las largas horas de laboratorio y hacerlas más agradables.

Mi agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible que este estudio haya sido llevado a término. No quiero olvidar a nadie, pero soy consciente de que es muy difícil plasmar en unas líneas toda la ayuda que he recibido durante este tiempo. Pido disculpas a todos aquellos que se sientan olvidados, mi agradecimiento es igualmente sincero.

INDICE

ABSTRACT

RESUMEN

I	INTRODUCCIÓN	1
	1.1 Importancia	2
II	ANTECEDENTES	
	2.1 Agente etiológico	4
	2.2 Biología de la Enfermedad	4
	2.3 Importancia en salud pública	6
	2.4 Epidemiología de la enfermedad	6
	2.5 Control	9
	2.6 Diagnostico de la enfermedad	10
	2.7 Diversidad Biológica	11
	2.7.1 Identificación de Genotipos o cepas de <i>E. granulosus</i>	12
III	OBJETIVOS	
	3.1 Objetivo general	22
	3.2 Objetivos específicos	22
IV	MATERIALES Y MÉTODOS	
	4.1 Población en estudio	23
	4.2 Obtención y evaluación de muestras biológicas	23
	4.3 Extracción de DNA	25
	4.4 Nested – PCR	25
	4.5 Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción	29
	4.6 Visualización de los productos de PCR	30
	4.7 Secuenciamiento	30
	4.8 Análisis de Datos	31
	4.8.1 Identificación de patrones	31
	4.8.2 Alineamiento de secuencias obtenidas	31
	4.8.3 Análisis filogenético	33
V	RESULTADOS	34
	5.1 Extracción de DNA	34
	5.2 Control de calidad del nested – PCR	34
	5.3 Nested – PCR	36
	5.4 Identificación de patrones por polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción	36
	5.5 Secuenciamiento	45

5.6	Alineamiento de secuencias	45
5.7	Análisis filogenético	46
5.7.1	Análisis mediante el algoritmo de neighbor-joining	46
5.7.2	Análisis de máxima parsimonia	48
5.7.3	Polimorfismo del DNA	50
5.7.4	Análisis filogenético por network	52
VI	DISCUSIÓN	55
VII	CONCLUSIONES	61
VIII	RECOMENDACIONES	62
IX	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	63
X	GLOSARIO	70

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1	Ciclo biológico de <i>E. granulosus</i>	5
Fig. 2	Distribución Geográfica de <i>Echinococcus granulosus</i>	7
Fig. 3	Ciclos biológicos propuestos para algunas cepas de <i>Echinococcus granulosus</i>, mostrando al hospedero definitivo y/o intermediario.	14
Fig. 4	Mapa del Perú, señalando Ayacucho , Pasco, Cuzco y Puno departamentos de donde provinieron las muestras del presente estudio.	24
Fig. 5	Estructura del DNA ribosomal que muestra las posiciones donde los primer son asignados durante el “annealing” del PCR.	26
Fig. 6	Tamaños obtenidos de los productos amplificados de <i>E. granulosus</i> : A: Patrón de 1056 pb; B: Patrón de 849 pb; 1: Utilizando los primers diseñados por Bowles J. y McManus D (1993); 2: Utilizando los primers diseñados por Rahimii (2007) y M: Marcador de 100 pb.	35
Fig. 7	Tamaños obtenidos de los productos amplificados de <i>E. granulosus</i> generados por el Nested - PCR: A: Patrón de 1056 pb; B: Patrón de 849 pb; M: Marcador de 100 pb. y <i>T.solium</i> (812 pb).	38
Fig. 8	Diferentes bandas obtenidas por digestión del producto de amplificación con la enzima Msp I: A: Patrón A (293 pb y 693 pb) y B: Patrón B (321 pb y 486 pb) y M: Marcador de 100 pb.	40
Fig. 9	Diferentes bandas obtenidas por digestión del producto de amplificación con la enzima Alu I: A: Patrón A (282 pb y 716 pb) y B: Patrón B (816 pb) y M: Marcador de 100 pb.	41
Fig. 10	Diferentes bandas obtenidas por digestión del producto de amplificación con la enzima Rsa I: A: Patrón A (307 pb y 672 pb) y B: Patrón B (357 pb y 428 pb) y M: Marcador de 100 pb.	42
Fig. 11	Diferentes bandas obtenidas por digestión del producto de amplificación con la enzima Taq I: A: Patrón A (1020 pb) y B: Patrón B (215 pb y 528 pb) y M: Marcador de 100 pb.	43

Fig. 12	Análisis filogenéticos mediante el algoritmo de neighbor-joining para <i>E. granulosus</i> basados en la secuencia de la región ITS1 del DNA ribosomal, con valores bootstrap obtenidos a partir de 1.000 pseudorréplicas.	47
Fig. 13	Análisis filogenéticos de <i>E. granulosus</i> basados en la secuencia de la región ITS1 del DNA ribosomal, con valores bootstrap obtenidos a partir de 1.000 pseudorréplicas. (A) Árbol de máxima parsimonia utilizando el programa MEGA.	49
Fig. 14	“Mismatch distributin” obtenido mediante el programa DNASP 4.0 para los 32 haplotipos obtenidos de <i>Echinococcus</i> spp analizados en el presente estudio.	51
Fig. 15	Nested cladograma de <i>Echinococcus granulosus</i> generado por los haplotipos ITS1	53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Cepas y aislamientos de especies de <i>E. granulosus</i>.	15
Tabla 2	Características de los 30 aislados de <i>E. granulosus</i> extraídos del Genbank para el diseño de los “primers”.	28
Tabla 3	Hospedero y origen geográfico de los aislados de <i>Echinococcus granulosus</i> usados como material referencial extraídos del Genbank.	32
Tabla 4	Distribución por departamentos de los patrones observados con el marcador ITS1 para <i>Echinococcus granulosus</i>.	37
Tabla 5	Distribución por departamentos vs hospedero intermediario del patrón A (1056 pb) observados con el marcador ITS1 de <i>Echinococcus granulosus</i>.	45
Tabla 6	Distribución por departamentos vs hospedero intermediario del patrón B (849 pb) observados con el marcador ITS1 de <i>Echinococcus granulosus</i>	44

RESUMEN

Echinococcus granulosus es el agente causal de la hidatidosis unilocular, patología de carácter endémico en amplias zonas de Perú. Actualmente la metodología del análisis molecular del ADN se ha utilizado para enriquecer los conocimientos sobre este parásito, a través del aislamiento de sus genes, el estudio de su estructura y organización, así como la expresión de los mismos. La aplicación de estas técnicas ha reconocido en *E. granulosus* un mínimo de 10 variedades o cepas..

La taxonomía y el estatus filogenético de las cepas de *E. granulosus* es controversial y esta bajo discusión; su variación genética ha sido analizada por la variación de las secuencias de los nucleótidos dentro de las regiones mitocondriales y nucleares del DNA. Estas variantes son referidas como cepas y han sido generalmente asignadas con el nombre del hospedero intermediario involucrado en el ciclo biológico del parásito. Se ha identificado la existencia de 10 genotipos (G1 – G10) de *E. granulosus*, esta variabilidad tiene implicaciones importantes en la patología de la enfermedad, desarrollo de vacunas, diagnóstico y administración de drogas efectivas.

En esta investigación, se han aislado quistes hidatídicos de ovinos, bovinos, porcinos y camélidos sudamericanos procedentes de Ayacucho, Cuzco, Pasco y Puno, departamentos pertenecientes a la sierra central y sur del Perú. La extracción del DNA fue con fenol –cloroformo – alcohol isoamílico; se aplicó un Nested-PCR usando el gen ribosomal ITS-1 y la genotipificación se hizo en base al uso de diferentes enzimas de restricción. De los dos patrones encontrados, los fragmentos producidos en el Nested-PCR fue amplificado y directamente secuenciado y a través de programas bioinformáticos se determinó la presencia de 2 variantes, una de las cuales corresponde a G1 y la otras probablemente restringida a nuestros camélidos sud-americanos. Aun cuando el número de aislados no es muy grande, el genotipo G1 (113/120) fue el de mayor prevalencia en los animales muestreados.

Echinococcus. granulosus endémico en algunas áreas de Perú, evidencia que los animales infectados con este parásito puede ser un potencial reservorio para infecciones humanas, además nuestros resultados constituyen un aporte importante para los programas de control que realizan una vigilancia continua de sus áreas endémicas a través de la implementación de un adecuado tratamiento de los animales infectados y el adiestramiento de los pobladores acerca de los riesgos de contraer la enfermedad y de las conductas adecuadas para el manejo de órganos infectadas.

En particular la existencia de diferentes patrones genéticos ha de contribuir a tomar medidas de importancia epidemiológica y a plantear estrategias posteriores donde el objetivo sea la prevención, tratamiento y control de las infecciones causadas por *E. granulosus* en sus diferentes hospederos de las distintas zonas endémicas de nuestro país.

ABSTRACT

Unilocular hidatidosis's disease whose etiological agent is the tapeworm *Echinococcus granulosus*, affects different endemic zones in Peru. At this time, the methodology of the molecular analysis of the DNA has been used for the knowledge of this parasite through isolation of its genes, the study of its structure and organization, as well as the expression of the same. The application of these techniques has revolutionized the study of this parasite, recognition a minimum of ten strains.

The taxonomic and phylogenetic status of *Echinococcus granulosus* strains are still controversial and under discussion; genetic variation in *E. granulosus* has been analyzed for DNA nucleotide sequence variation within of the region mitochondrial and nuclear region of the ribosomal of DNA. These variants are referred to as strains, and they have been generally named after their typical intermediate hosts. To date, 10 genotypes (G1 – G10) of *Echinococcus granulosus* have been identified; this variability has important implications for the pathology of the disease, development of vaccines, diagnostic reagents and drugs effective against this parasite.

In this research, we isolate different hydatidic cysts from ovines, bovines, pork and sudamerican camels, this samples was get from Ayacucho, Cuzco, Pasco and Puno, all belong from central highland and south of Peru. The DNA extraction was done with phenol- chloroform- isoamil alcohol. We did Nested-PCR using primers from ribosomal genes ITS-1, and then the genotyping was done with RFLP PCR using different cutting restriction enzymes. We found two genetics patterns. The representatives patterns, their fragments produced by nested-PCR were amplified and directly sequenced and then with Bioinformatics programs determine one patterns belong G1 and others was probably restricted from south-American camels that live in high altitudes in Peru. Although the number of Peruvian isolates examined was not extensive, the G1 genotype (113/120) was far more prevalent in domestic animals. Besides ours dates constitute an important contribution for the Control programs that realize a continuous

monitoring of endemic areas through the implementation of a suitable treatment of the animal infected and the training of the settlers about the risks of contracting the disease in contaminated areas and of the conducts adapted for the handling of infected organs.

In particular, the existence of different genotypes has to contribute to take measures from importance epidemiologist and to establish strategies where the objective is the prevention, treatment and control of the infections caused by *E. granulosus* in their different hosts from the different endemic zone from Peru.

I) INTRODUCCION

La equinococosis quística (EQ) es una zoonosis parasitaria producida por un céstode de la familia *Taenidae*: *Echinococcus granulosus* y ha sido identificada desde hace siglos como un importante problema en salud pública en muchos países del mundo (2, 4, 10, 14, 21, 41, 48, 60). Además, existen indicios que apuntan a una presencia creciente en algunas regiones del mundo (30).

La EQ mayormente se encuentra representada por la transmisión entre el perro doméstico y la oveja, la cual tiene como huéspedes definitivos al perro doméstico y algunos cánidos silvestres y como huéspedes intermediarios a los herbívoros y al hombre (6, 7, 8, 10, 17).

La EQ se encuentra presente a lo largo de muchas partes de Sudamérica, Este del África, Australia, Europa Central, Asia Central y el Litoral Mediterráneo (14, 21, 22, 41, 48, 60, 63, 64) y persiste por la presencia de uno o varios hospederos definitivos y uno o varios hospederos intermediarios. Además es necesario que por lo menos uno de los hospederos definitivos mantenga estrecho contacto con el hombre (30). La convivencia del ser humano con los caninos, las deficientes condiciones higiénicas sanitarias, bajos niveles socioeconómicos y culturales interviene como factores importantes en la cadena de transmisión y persistencia de la infección (59).

Las zonas de la sierra central y sur del Perú reúnen las características ecológicas, culturales, económicas y sociales que permiten el mantenimiento del ciclo de vida de este parásito siendo estas áreas reportadas como endémicas no solo de EQ ovina sino también de EQ humana . En nuestro país, el ganado intermediario *de E. granulosus* son los ovinos, bovinos, caprinos, camélidos sudamericanos (llama, alpaca y vicuña) y porcinos, este ganado se distribuye principalmente en la cordilleras andina (3, 15, 46, 49).

Las técnicas empleadas en los estudios parasitológicos iniciales eran de tipo morfológico y biométrico para determinar la morfología del parásito, la forma y número de sus proglótidos, las dimensiones de sus ganchos rostelares y la anatomía de

su aparato reproductivo. Posteriormente se recurrió al examen bioquímico y al uso de marcadores enzimáticos, seguidos de técnicas de biología y genética molecular que permitieron avanzar en la discriminación de las especies reconocidas del género *Echinococcus* y a su vez demostrar diferencias trascendentales en los fenotipos y genotipos de variantes de *E. granulosus* aisladas de diferentes hospederos (6, 7, 8, 9) sugiriendo la existencia de cepas adaptadas a sus respectivos hospederos (2).

Hoy se considera cepas a toda variante que difiere de otros grupos de la misma especie en las frecuencias génicas y en uno o más caracteres de significado real o potencial para la epidemiología y el control de la equinococosis (6, 7, 8, 30). Se ha descrito en Sudamérica la presencia de distintas cepas de *E. granulosus*: G1 o *Cepa ovina*, G5 o *Cepa bovina*, G6 o *Cepa camélida* y G7 o *Cepa porcina* (6, 7, 8).

Actualmente la filogenia molecular de este grupo dispone de datos moleculares muy limitados. Es de considerar que en la actualidad en el Perú no existe un análisis detallado del genoma de *E. granulosus* y de sus cepas infectivas, por lo tanto el presente estudio buscó genotipificar las diferentes cepas de este parásito a partir de los quistes hidatídicos de diferentes hospederos provenientes de la zonas de la sierra central y sur del Perú; es de suma importancia identificar estas para diseñar programas que intenten reducir la prevalencia o erradicar la infección.

1.1.- IMPORTANCIA

Al comienzo del siglo XXI el control de la EQ fue derivado hacia un enfoque más amplio que incluye varios componentes: i) el análisis detallado de las condiciones locales (particularidades del ciclo, dinámica de la transmisión y comportamiento de la población humana en riesgo); ii) el uso de nuevas tecnologías en el estudio del ser humano y los animales infectados y iii) aplicación de desarrollos recientes, tales como la vacunación de los hospederos intermediarios, el uso del inmunodiagnóstico en la vigilancia epidemiológica y la simulación de los impactos del control. Esta visión más amplia del problema ha sido posible gracias a diversos factores, entre los cuales cabe destacar: notables contribuciones de ciencias y disciplinas clásicas como la taxonomía,

la farmacología, las matemáticas y relevantes aportes de nuevas disciplinas científicas (biología molecular, ingeniería genética e inmunología), con la realización de investigaciones multidisciplinarias, la configuración de equipos intersectoriales y la profundización de la cooperación nacional e internacional (13).

Estas tecnologías permitieron también demostrar diferencias trascendentales en los fenotipos y genotipos de variantes de *E. granulosus* aisladas de diferentes hospederos, llegándose a identificar actualmente hasta 10 cepas o genotipos (6, 7, 8, 31), tales diferencias afectan tanto al desarrollo como a la capacidad infectante de cada una de las variantes teniendo implicaciones de gran importancia para el diseño de los programas de control (48). Entre ellas cabe subrayar las variaciones en el tiempo de maduración de las diferentes cepas del parásito, con las consecuentes repercusiones en la determinación del intervalo de la administración de antihelmínticos y la distinta patogenicidad para el ser humano, lo que torna conveniente identificar la variedad cuando se va a intentar reducir la prevalencia o erradicar la infección (13).

II ANTECEDENTES

2.1.- AGENTE ETIOLOGICO

El *Echinococcus granulosus* es un parásito que en la fase adulta puede medir de 2-7mm de longitud y normalmente poseen tres, raramente hasta cuatro proglótidos. El penúltimo proglótido se encuentra maduro mientras que el terminal es el proglótido grávido, este mide alrededor de la mitad del céstode. El rostelo tiene dos hileras de ganchos como parte de una extensión del ésclex. El ovario presenta forma de riñón y los poros genitales alternan irregularmente (30).

Este parásito en su fase larvaria forma quistes redondeados de tipo unilocular y están formados por una gruesa membrana externa y otra interna delgada y compleja que permite el crecimiento y la reproducción del parásito. Esta fase larvaria generalmente se encuentra en los pulmones y/o hígado, sin embargo puede ubicarse en otras áreas del cuerpo siempre y cuando los embriones del parásito puedan ser filtrados de la sangre hacia otros órganos del hospedero (17).

2.2.- BIOLOGIA DE LA ENFERMEDAD

El Ciclo de *Echinococcus* spp. (Fig. 1) como el de todos los miembros de la familia *Taenidae*, tiene tres fases sucesivas: i) El adulto, que parásita el intestino del depredador (canidos y felinos) hospedador definitivo, ii) La larva desarrollada como embrión en el huevo y que eclosiona al ser ingerida por el hospedador que en su mayoría son herbívoros como ovejas, cabras, vacas, camélidos, caballos así como también a los cerdos (6, 7, 8, 9, 17) y el hombre que constituye un hospedero accidental (1, 30,) y iii) El metacéstodes es el estado intermedio entre la larva oncósfera y el adulto, donde con frecuencia se produce una multiplicación clonal de futuros individuos. Los metacéstodes son los quistes hidatídicos (17,23).

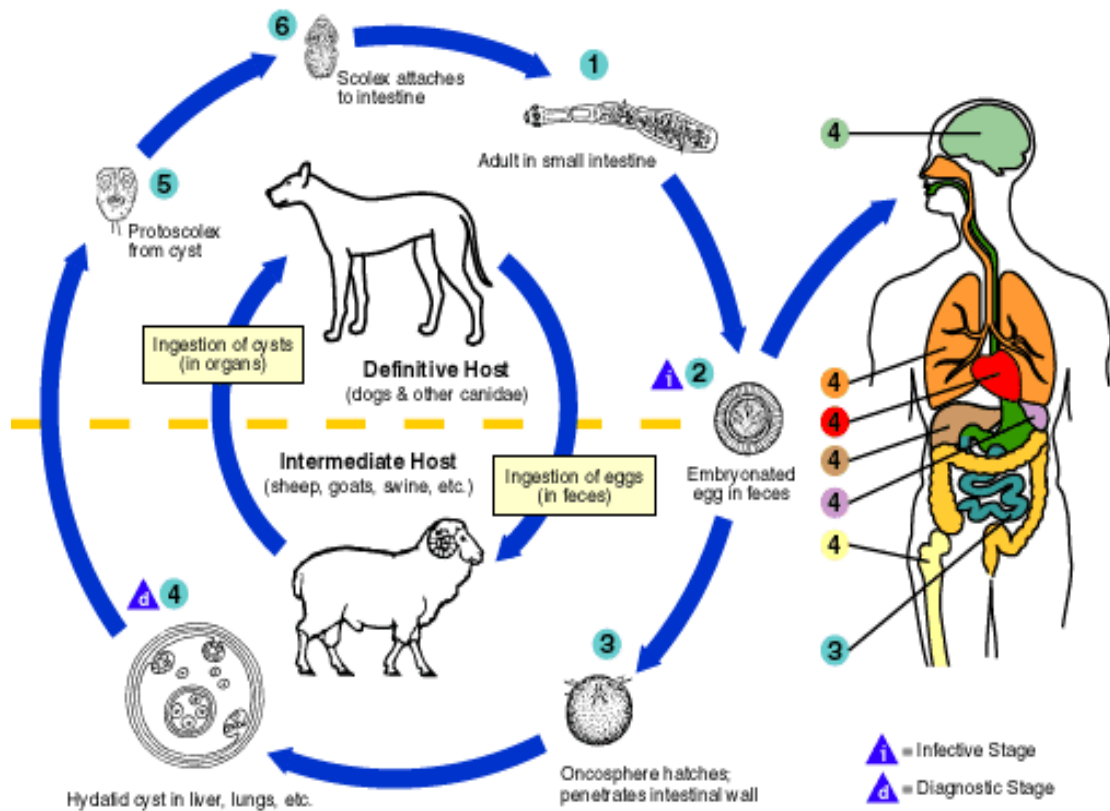


Fig. 1 Ciclo biológico de *Echinococcus granulosus*

Fuente: CDC: Center for Disease Control & Prevention Nacional Center for Infectious Diseases Division of Parasitic Diseases

2.3.- IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA

La EQ es una importante enfermedad zoonótica en muchos países del mundo (Fig. 2) y como ya hemos mencionado el hombre puede desarrollar hidatidosis que a menudo es asintomática en los primeros años. La enfermedad clínica aparece cuando el quiste adquiere un tamaño significativo y suele ser el resultado de la compresión de distintos órganos; otras veces la enfermedad es detectada como un hallazgo fortuito en la autopsia o en conjunto con otras enfermedades. La EQ en el hombre es responsable de pérdidas económicas que se extiende más allá del enfermo y alcanza un efecto negativo en su producción y economía; además se debe tener en cuenta los gastos que demanda la hospitalización y las intervenciones quirúrgicas de los pacientes, sin contar con las posibles complicaciones que podrían ocurrir. De la misma manera existe la posibilidad de recurrencia, activación de quistes en estado de latencia o reinfección de los pacientes (4). Igualmente esta enfermedad constituye un enorme problema económico en la industria pecuaria que se refleja no sólo en pérdidas por decomiso de vísceras infectadas, sino también por menor producción de carne, leche y lana. (30).

Su importancia en Salud Pública no radica sólo en su incidencia que no es muy alta, ni en su mortalidad, prácticamente hoy inexistentes; sino en la necesidad de prevención. En efecto la destrucción sanitaria de las vísceras decomisadas en los mataderos, así como el entierro de animales muertos son las medidas más adecuadas para la reducción de su incidencia (22).

2.4.- EPIDEMIOLOGIA DE LA ENFERMEDAD

La EQ se encuentra diseminada en los cinco continentes como una entidad que se establece cuando el parásito está presente en diversos individuos que ofician como huéspedes adecuados compartiendo un mismo ambiente y dentro de un marco plural multicausal (20). América del sur se encuentra entre las regiones más afectadas (17), la tasa de prevalencia de la infección por *E. granulosus* para el 2004 en ovinos alcanzaba en el sur de Brasil el 26%, en Perú 77,4%, en Chile 60 - 80%, en Uruguay 18%, y en Argentina 61%. (30).

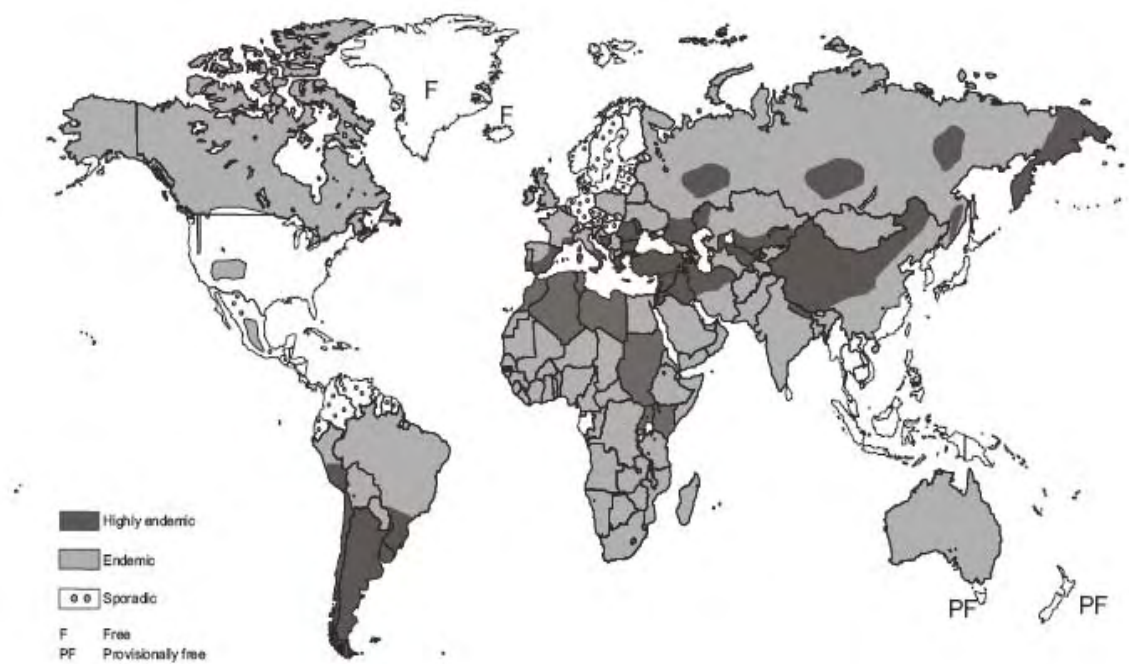


Fig. 2 Distribución Geográfica de *Echinococcus granulosus*.

Fuente: WHO/OIE Manual on equinococosis in Human and animals. 2002.

Esta enfermedad es más frecuente en países donde se practica el pastoreo y los perros juegan un rol importante en esta faena. El Perú es considerado un país endémico con una alta prevalencia (15, 36, 43, 44, 46), aun cuando incesantemente se aplican medidas de control y las zonas principalmente afectadas son las regiones ganaderas de la sierra central y sur, donde el ganado intermediario de *E. granulosus* son los ovinos, bovinos y camélidos sudamericanos. Aunque la enfermedad se considera de ambiente rural, también se ha observado en zonas urbanas debido a la presencia de animales infectados procedentes de las zonas endémicas (44).

Debemos reconocer que el soporte fundamental que tiene esta enfermedad son los factores socio-ecológicos propios de las prácticas en regiones agrícolas y ganaderas. Las actitudes, formas de alimentación y manejo en las poblaciones huéspedes son una constante en las diversas poblaciones involucradas. Asimismo la falta de mecanismos adecuados en la aplicación de controles legales en la inspección de alimentos de origen animal en pequeñas comunidades (30). En el caso del hombre, se ha observado una asociación entre el origen del agua de beber y la EQ siendo mayor la prevalencia entre aquellos que toman aguas no seguras. Esto podría ser un indicador de un conjunto de factores higiénicos, culturales e infraestructura asociados a predios con este tipo de característica (10).

De acuerdo a la distribución de algunas especies del género *Echinococcus* se observa el rol que pueden cumplir los animales silvestres en la transmisión, estos podrían ejercer acciones en los ciclos domésticos o se establecerían en poblaciones refugio que perpetuarían la enfermedad en otros huéspedes; por lo tanto surge la importancia de conocer las cepas que actúan en los diferentes nichos y por ende los patrones de transmisión e identificar las formas infectivas para el hombre (49). Hay que tener en cuenta que los huéspedes definitivos pueden tolerar altas cargas de parásitos y no padecer perturbaciones que induzcan a la muerte (27).

Moro *et al.* (1994), describió que la EQ permanece en los Andes Centrales Peruanos siendo un problema de menor significancia en Lima. Reportó una prevalencia hasta del 66% de EQ en ovinos en la Cooperativa agraria Túpac Amaru, Pachacayo – Junín y cuya localización fue pulmones e hígado. Además encontró una

sero-prevalencia para EQ humana de 1.9% mediante la prueba de Electroinmunotransferencia Blot (EITB) (42).

Otro estudio epidemiológico de esta enfermedad llevado nuevamente en la Cooperativa agraria Túpac Amaru, Pachacayo – Junín en 1999 describió que la prevalencia de EQ humana fue del 9.1% y fue el reporte más alto en Latinoamérica. La frecuencia de presentación de la enfermedad en el hígado, pulmones y en ambos órganos fue 3.4%, 2.0% Y 0.2% respectivamente. Dichas prevalencias de infección fueron determinadas por medio de ultrasonido, rayos X y EITB. Asimismo se encontró una prevalencia extremadamente alta del 32% de *E. granulosus* en perros después de la purga con Bromohidrato de Arecolina y una prevalencia del 87% de EQ en el ovinos (44).

2.5.- CONTROL

La selección de medidas específicas de control y la aplicación estratégica de las mismas deben basarse en la situación epidemiológica del área local, pero muchos de estos programas han fracasado debido a múltiples causas, entre ellas se encuentra la inestabilidad política, el movimiento de los hospederos definitivos e intermediarios a través de las fronteras, la dificultad de acceder a todos los hospederos definitivos, una serie de factores sociológicos como la costumbre de alimentar a los perros con vísceras de ganado y la dificultad de mantener un programa regular antihelmíntico mensual o semestral para todos los perros por más de 20 años (26).

La vacunación de los hospederos intermediarios podría ser utilizada como una herramienta para el control de la transmisión de *E. granulosus*, de esta manera se conseguiría reducir efectivamente la prevalencia de la hidatidosis humana y ovina (26). En los últimos años se han venido desarrollando una vacuna basada en un antígeno recombinante, denominado EG95 proveniente de las oncosferas de *E. granulosus*, obteniéndose una protección de 96 a 98% en las ovejas (35).

2.6.- DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD

El diagnóstico de *E. granulosus* en perros vivos es realizado generalmente mediante la purga con bromohidrato de aerocolina y examen de las muestras fecales para detectar la presencia de parásitos adultos. Este procedimiento no sólo es riesgoso para los canes, sino que también representa un riesgo de infección para el personal involucrado (38), así mismo este método resulta ineficiente cuando nos encontramos frente a cargas parásitas bajas. Otro de los métodos aun más inconveniente es la búsqueda de parásitos en el contenido intestinal luego de la necropsia de los canes. Estos métodos presentan una baja sensibilidad y reproducibilidad. Los ensayos en material fecal han sido desarrollados, pero estos procedimientos no presentan una buena sensibilidad y especificidad (28).

Verastegui *et al.* (1992), realizaron un estudio en hidatidosis humana utilizando las técnicas de Electroinmunotransferencia Blot (EITB) y *Enzyme- Linked immunosorbent assay* (ELISA), encontrando que el EITB ofrece una mayor sensibilidad y especificidad y sugirió que es una buena herramienta para estudios sero-epidemiológicos en áreas donde la cisticercosis y la hidatidosis son endémicas (56). Igualmente Moro en 1997 demostró que el EITB en el diagnóstico de hidatidosis ovina posee una moderada sensibilidad (73%) y una alta especificidad (98%) y no se observan reacciones cruzadas con otros céstodes (43).

En otro estudio Carmena *et al.* (2006), mencionan que para el inmunodiagnóstico exacto de las infecciones por *E. granulosus* se requiere de antígenos altamente específicos y sensibles, La opción de una fuente apropiada del material biológico es un punto crucial en mejorar las características de las pruebas diagnósticas y se debe basar en la etapa del desarrollo del parásito y del huésped. Las fuentes antigénicas mas comunes usadas son líquido hidatídico, extractos somáticos y productos excretorios-secretorios de protoescolices o de los gusanos adultos de *E. granulosus* (9).

2.7.- DIVERSIDAD BIOLOGICA

El DNA es la molécula que contiene el código genético, siendo sus propiedades el reflejo directo de la identidad genotípica y fenotípica de cada organismo, es muy utilizada en la identificación de especies debido a que está menos influenciada por los efectos del ambiente y además la interpretación de los resultados es más objetiva. Un fragmento de DNA que representa variación genética (polimorfismo) debido a diferencias entre los individuos en la longitud o secuencia de la doble cadena en un locus en particular se denomina marcador molecular. Los marcadores moleculares de DNA son muy estables y por lo tanto útiles en la identificación de especies y poblaciones. Hasta hace algunos años, en los estudios en sistemática se utilizaban casi siempre caracteres morfológicos. Sin embargo, existen caracteres que pueden estar sometidos a la subjetividad de quien los analiza, no todos los caracteres relevantes son apreciables a simple vista, o no tenemos la capacidad para definir inequívocamente las homologías. En la actualidad las herramientas que se utilizan en la sistemática se han extendido; ahora no sólo se toman en cuenta los caracteres morfológicos, sino también los caracteres moleculares (34).

El espaciador transcrito interno (ITS) del DNA ribosómico (DNAr) nuclear, contiene dos regiones variables no codificadoras, que se encuentran dentro de las repeticiones altamente conservadas del DNAr, entre la subunidad pequeña, la región 5.8S y los genes que codifican para RNAr de la subunidad grande. La funcionalidad del ITS esta relacionada con la división específica dentro del transcripto primario ITS-1 e ITS-2 durante la maduración de las subunidades pequeñas, 5.8S, y la subunidad ribosomal grande. Entre las características convenientes para el análisis de secuencias ITS en parásitos, se encuentran: la región ITS y puede amplificarse fácilmente con "*primers*" universales; la naturaleza multicopia de las repeticiones del DNAr hace de esta región una secuencia fácil de amplificar, aun cuando se utilicen muestras pequeñas de DNA, muy diluidas o altamente degradadas. Finalmente diversos estudios han demostrado su utilidad en el análisis filogenético (19).

El análisis de secuencias esta siendo empleado por algunos investigadores para construir nuevos árboles filogenéticos que están revolucionando la sistemática de los organismos vivos y es tal vez esta área donde el análisis de secuencias ha dado los mayores resultados inmediatos (19). Esta información está almacenada en bases de datos internacionales, a las cuales los investigadores envían las secuencias una vez que son determinadas. El explosivo crecimiento de la información genómica y las complejas relaciones a través de las cuales debe ser relacionada, esta exigiendo a las ciencias de la computación el desarrollo de cada vez mas sofisticados esquemas de diseño y administración de bases de datos y se puede decir que en los últimos años la información biomédica esta empujando el desarrollo de más ciencias (53).

2.7.1.- IDENTIFICACION DE GENOTIPOS O CEPAS DE *E. granulosus*

Se ha reconocido que *E. granulosus* posee un alto grado de diversidad genética basado en cambios en las secuencias de los ácidos nucleicos que se reflejan en caracteres fenotípicos que afectan diversos patrones del ciclo de vida, desarrollo, control y tratamiento del parásito (6, 7, 8, 16, 17, 18).

Algunos investigadores han realizado estudios de correlación entre la morfología de los ganchos rostelares de los protoescolex y el análisis de las muestras mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Polimorfismo de longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), uno de estos estudios fue realizado en Irán en el 2006, donde se confirmó la presencia de los genotipos G1 en ovinos y humanos y G6 en camélidos, donde el análisis molecular presentó concordancia con la morfología (2). Si bien es cierto que el uso de los caracteres morfológicos es rápido y práctico, no siempre es eficiente para la validez de estudios de variaciones ínter-específicas, algunos parásitos con similar morfología muestran diferencias epidemiológicas. Por estas razones el uso de métodos moleculares a base de DNA nuclear o mitocondrial, son requeridos (48, 54).

Sin embargo algunas veces se han presentado ciertas dificultades en el uso del PCR y RFLP del espacio interno transcrito (ITS1) para la caracterización de *E. granulosus* probablemente como resultado de la extracción del DNA, pero la razón

más importante es la contradicción del uso de secuencias de *Schistosoma mansoni* para estudios moleculares de *E. granulosus* (48, 54), obtenidas por los siguientes “primers”: BD1: GTC GTA ACA AGG TTT CCG TA; 4S: TC TAG ATG CGT TCG AA(G/A) TGT CGA TG y han sido usadas por otros investigadores como (6). Por estas consideraciones recientemente con las diferentes secuencias de *E. granulosus* depositadas en el Gen Bank, se ha diseñado unos nuevos y específicos “primers” para el análisis molecular de este parásito (48).

Si bien inicialmente sólo cuatro especies han sido reconocidas taxonómicamente dentro del género *Echinococcus*, hoy en día este hecho está en discusión y apunta a dividirlo a más especies. Se han aceptado 4 especies en el género *Echinococcus*: *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. vogeli* y *E. oligartus*, siendo solamente *E. granulosus* y *E. multilocularis*, implicadas en la infección a humanos (8, 33). En el año 2005 en el Tibet, Xiao valida una nueva especie basado en secuencias nucleares y mitocondriales a la que denomina: *E. shiquicus*, encontrada en zorros tibetanos (*V. ferrilata* y *O. curzoniae*) endémicos de esta área y que servirían de hospederos naturales para esta nueva especie, los cuales están adaptados solo a sobrevivir en altas altitudes, prediciendo que la distribución de *E. shiquicus* estaría restringida a estas especies y a esta región geográfica localizada a aproximadamente 4000 msnm. (61, 62).

Se ha reconocido que *E. granulosus* posee un alto grado de diversidad genética, identificándose 10 cepas genéticas, designadas desde G1 a G10 (Fig. 3, Tabla 1) mediante la secuenciación de los genes COI, ND y ITS-1, entre las que se pueden mencionar a: G1 (cepa ovina), G2 (cepa ovina de tasmania), G3 (cepa búfalo), G4 (cepa equina), G5 (cepa bovina), G6 (cepa camélida), G7 (cepa porcina), G8 (cepa cérvido) (6, 7, 8, 49, 54, 57, 58), G9 (cepa león) (54) y G10 (cepa cérvido de Fennoscandian) (31, 54).

Echinococcus granulosus

Ciclos biológicos propuestos para algunas variedades

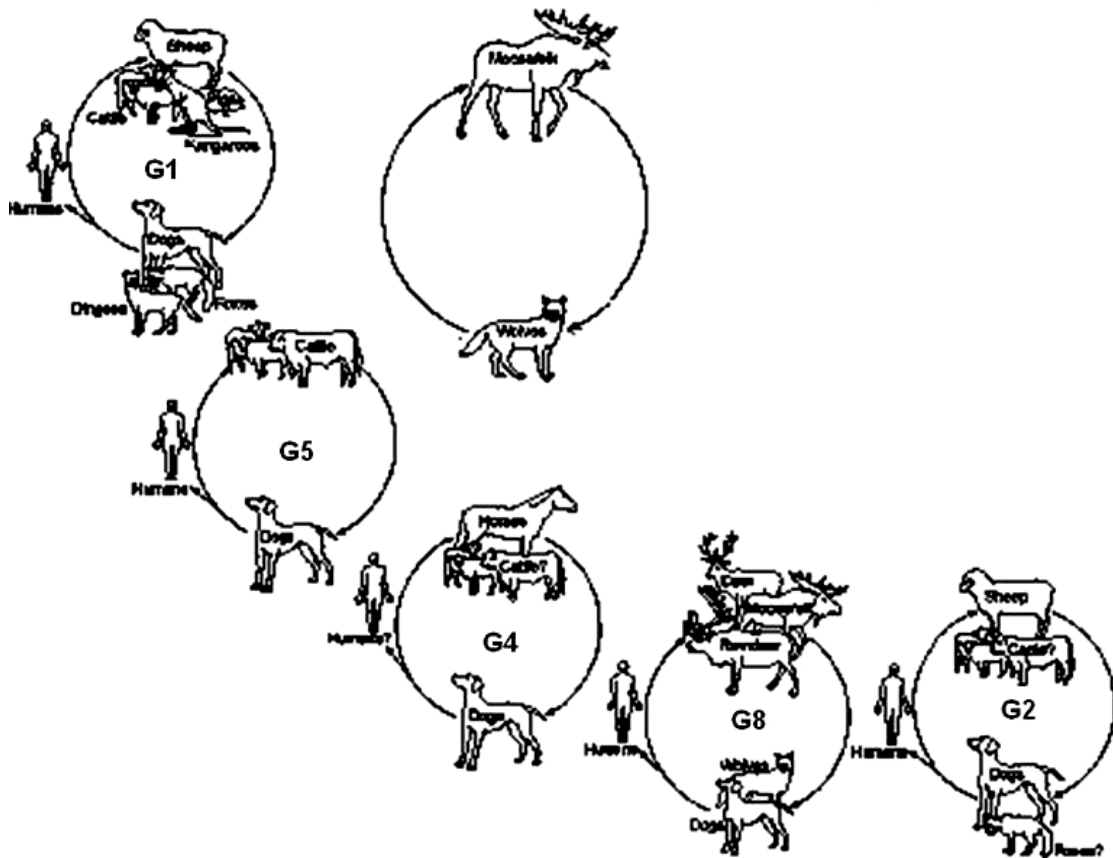


Fig.3 Ciclos biológicos propuestos para algunas cepas de *Echinococcus granulosus*, mostrando al hospedero definitivo y/o intermediario

Fuente: Thompson A and McManus D. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. Trends in Parasitology. 2002

Tabla 1. Cepas y aislamientos de especies de *E. granulosus*

Cepa	Hospedero intermediario	Infec. en humanos	Hospedero definitivo	Probable distrib. geográfica	Designación taxón propuesta
G1 (<i>Cepa ovina</i>)	Ovino, bovino, cerdos, camélidos.	Si	Perro, zorro, chacal, hienas	Australia, Europa, USA, Nueva Zelanda, África, China, Sur América, Rusia, Tasmania, Argentina.	<i>E. granulosus</i>
G2 (<i>Cepa ovina</i> de Tasmania)	Ovino, bovino.	Si	Perro, zorro	Tasmania, Argentina	<i>E. granulosus</i>
G3 (<i>Cepa Búfalo</i>)	Búfalo, bovino	?	Perro, zorro	Asia	<i>E. granulosus</i>
G4 (<i>Cepa equino</i>)	Caballo	No	Perro	Europa, Medio oriente, Sur América	<i>E. equinus</i>
G5 (<i>Cepa bovina</i>)	Bovino	Si	Perro	Europa, Sur África, India, Sri-Lanka, Rusia, Sur América ?	<i>E. orleppi</i>
G6(<i>Cepa camélido</i>)	Camelidos	Si	Perro	Medio oriente, África, China y Argentina	<i>E. granulosus?</i>
G7 (<i>Cepa porcina</i>)	Cerdos	Si	Perro	Europa, Rusia, Sur América	<i>E. granulosus?</i>
G8 (<i>Cepa cérvido</i>)	Ciervos	Si	Lobo, perro	Norte América	<i>E. granulosus?</i>
G9? (<i>Cepa León</i>)	Cebras, Búfalos , Antílope, Jirafa?, Hipopótamo?	?	León	África	<i>E. granulosus?</i>
G10 (<i>Cepa cérvido de Fennoscandian</i>)	Ciervos	Si	Lobo	Finlandia	<i>E. granulosus?</i>
<i>E. multicularis</i>					
Europea	Roedores domésticos, mono	Si	Zorro, perro, gato, lobo,	Europa, China?	<i>E. multicularis</i>
Alaska	Roedores	Si	Zorro, perro, gato	Alaska	<i>E. multicularis</i>
Norte América	Roedores	Si	Zorro, perro, gato, coyote	Norte América	<i>E. multicularis</i>
Hokkaido	Roedores, cerdo, mono, caballo	Si	Zorro, perro, gato	Japón	<i>E. multicularis</i>
<i>E. vogeli</i>					
No reportado	Roedores	Si	Perro	Centro y Sur America	<i>E. vogeli</i>
<i>E. oligarthrus</i>					
No reportado	Roedores	Si	Felinos	Centro y Sur America	<i>E. oligarthrus</i>

?: Incierto, se requiere mas datos.

Fuente: Thompson A and McManus D. Towards a taxonomic revision of the genus Echinococcus. Trends in Parasitology. 2002

Zhang *et al.* (1998), analizaron 28 aislamientos de *E. granulosus* provenientes de la región de Xinjiang Uygur en China. Las muestras fueron obtenidas a partir de ovejas, bovinos, camellos y de quistes hidatídicos humanos y tras aplicar un protocolo de secuenciación del DNA, determinaron la existencia de los genotipos G6 y G1. Este último genotipo fue aislado en forma exclusiva de muestras provenientes de la zona norte de la provincia de Xinjiang Uygur (63). El mismo equipo, publicó el resultado del análisis de 16 aislamientos de *Echinococcus* provenientes de pacientes iraníes que habían sido intervenidos quirúrgicamente y de animales domésticos (incluyendo ovejas, bovinos, cabras y camellos) del área geográfica de Teherán; las muestras fueron tratadas mediante un protocolo de análisis de los nucleótidos del DNA y tras aplicar una reacción de PCR y enzimas de restricción encontraron dos genotipos diferentes G1 y G6 (64).

Snabel *et al.* (2000), estudiaron el genotipo de protoescolices de cerdo provenientes del territorio eslovaco, aplicando un protocolo de secuenciación mitocondrial y nuclear, encontrando una alta afinidad de las muestras con el genotipo G7, lo que constituyó en el primer reporte de la existencia del genotipo G7 en Eslovaquia (52).

González *et al.* (2002), analizaron 53 aislamientos de *E. granulosus* provenientes de la región central de España, y encontraron 2 grupos genéticos dentro de los aislamientos procedentes de porcinos: los genotipos G1 y G7. Esta observación podría tener un impacto significativo en la salud pública de España, ya que estos porcinos podrían infectar a seres humanos como se ha sido informado en Europa Oriental y Central (21).

Posteriormente, Mwambete *et al.* (2004), analizaron muestras de quistes que se obtuvieron de ovejas, cabras, bovinos, cerdos y caballos sacrificados en mataderos locales del centro de España, a los que se adicionaron especímenes provenientes de quistes hidatídicos humanos y de cerdos salvajes cazados en la zona central de España. Trabajaron con 248 aislamientos provenientes de quistes hepáticos y pulmonares; las muestras fueron analizadas por Polimorfismo del DNA amplificado al Azar (RAPD) y

comparadas con el análisis de secuencias para COI y ND1, encontrando 3 diferentes genotipos: G1 (ovejas con quistes fértiles y en cabras, bovinos, porcinos y cerdos salvajes con baja fertilidad de quistes), G4 (caballos, quistes exclusivamente pulmonares), y G7 (porcinos, cabras y cerdos salvajes). Estos resultados son relevantes en la epidemiología de la enfermedad, ya que estos datos constituirían el primer reporte de infecciones de cerdos salvajes con G1 en Europa. Este genotipo es uno de los más importantes por poseer un amplio rango de hospederos intermediarios responsables de infecciones humanas (47).

En el 2003 un estudio realizado en Finlandia con muestras de *E. granulosus* provenientes de ciervos y roedores de este país, utilizando los genes COI, NDI y ITS1 se encontró por análisis molecular que los aislamientos se presentaban distintos, razón por la que se planteó que se trataba de un nuevo genotipo, a la que denominaron " *Fennoscandian cervid strain* " y la asignaron como G10 (31). El mismo grupo de investigadores en el 2006 realizan otro estudio con 33 aislados de *E. granulosus* aislados de cérvidos de Finlandia y de Suecia utilizando los genes ND1, ND3, ATP6 y CO1, encontrando que los aislados representaban al nuevo genotipo (G10). Además el análisis filogenético mostró que G6, G7, G8 y G10 forman un solo *cluster*, proponiendo a su vez que deben ser separados como una nueva especie de *Echinococcus*, difiriendo claramente de G1 y G4; aunque es necesario realizar estudios adicionales que evalúen esta decisión (32).

Thompson *et al.* (2006), interesado en la denominación de esta nueva cepa (G10), realizó un estudio a partir de aislantes del *Echinococcus* spp provenientes de ciervos de Canadá y con ayuda de los resultados del estudio anterior, reveló que *Echinococcus* del origen cérvido es fenotípicamente y genéticamente distinto al mantenido en hospederos domésticos y que no constituye un grupo genéticamente homogéneo. Sin embargo, sus datos aunque no apoyan la existencia de 2 genotipos distintos con distribuciones geográficas separadas, presume la existencia de solamente una especie y manifiesta que los aislantes provenientes de ciervos y lobos de otras regiones endémicas deben ser caracterizados antes de que una decisión final se tome respecto a este nivel taxonómico (55).

Actualmente existe todo un debate sobre estas cepas G6, G7, G8 y G10 presumiéndose ser una especie distinta a *E. granulosus*, proponiendo denominarla como *Echinococcus canadensis*, (32, 55). Otros autores reafirman que solo G6 y G7 sean denominadas con este nuevo nombre científico (37).

El análisis filogenético de secuencias mitocondriales en combinación con secuencias nucleares han demostrado una distinción evolutiva de G1 y G4 (24, 33), esto toma una fuerte consistencia debido a que no se ha reportado infecciones humanas con G4 (cepa equina) y no se ha identificado infecciones en caballos con G1(cepa ovina). Considerando la evidencia acumulada, se ha propuesto que G4 sea reconocida como una especie distinta: *E. equinus* (8, 33, 39, 40)

Caso similar ocurre con G5 (cepa bovina) proponiéndose que sea reinstalada y reconocida como *E. ortleppi* tal como se le asignó en 1943 en base a la evaluación descrita por Ortlepp, esta forma de *Echinococcus* adaptada a los bovinos como hospederos intermediarios es característica por su naturaleza de desarrollar al metacestode en el pulmón con la producción predominante de quistes fértiles y su desarrollo rápido a gusano adulto. G1 (cepa ovina) puede infectar de forma accidental a bovinos pero raramente produce quistes fértiles. (40, 54)

Otros estudios sugieren que G2 (cepa ovina de Tasmania) ha divergido recientemente de G1 (cepa ovina) posiblemente bajo la influencia de condiciones ambientales o por intensos tratamientos con droga en el hospedero definitivo (39). En 1992 se reportó que usando los genes de COI se observaba similitud entre G1, G2 y entre G6, G7, que indicaban que la secuencia obtenida para G2 difiere de G1 en 3 de los 366 nucleótidos y 2 de estas variantes corresponderían al cambio en un aminoácido y que G6 (cepa camélida) difiere de G7 (cepa porcina) en solo una posición de un nucleótido, aunque han sido separados porque otras evidencias suponen ser genotipos distintos (5).

En particular, la técnica del PCR-RFLP y el secuenciamiento brindan la identificación de las diferentes especies de *E. granulosus* y sus diferencias genotípicas con gran exactitud y eficacia. Con el uso de la técnica de PCR – RFLP para la región

ITS1 usando los "primers" BD1 y 4S, se llevo a diferenciar fragmentos para las diferentes cepas: G1: 1 kb y 0,9 Kb (clon S); G4: 1.06 kb; G5: 1,06 kb; G6: 1,1 (clon L) y 1 Kb (clon S) estos fragmentos fueron verificados por medio de sondas de hibridización. Un alícuota del fragmento ITS1 amplificado fue digerido con diferentes enzimas, donde las cepas equina (G4) y bovina (G5) fueron indistinguibles con las enzimas *Msp1* y *Alu1*, a diferencian con *Cfo1*, *Rsa1* y *Taq1* que fue distinguible (6).

En América del Sur se han reportado 5 genotipos (G1, G2, G5, G6 y G7) en diferentes hospederos (3, 25). Esto es de suma importancia, ya que se ha demostrado que en algunos países sudamericanos la variedad que esta mas asociada a la infección al hombre es la cepa G1 o cepa ovina (1). Este dato tiene considerables implicancias en las medidas a tomar en un programa de control de la EQ de un país, ya que el tiempo de maduración se diferencian dependiendo del tipo de cepa que se trate (12, 13).

Estudios realizados en Argentina mediante ensayos moleculares han determinado la presencia de *E. granulosus* en muestras obtenidas de quistes hidatídicos aislados de distintos hospederos y de diferentes áreas geográficas. Para ello se realizó el análisis molecular de las cepas de *E. granulosus* que infectan tanto al hombre como a los animales domésticos. La PCR demostró ser de utilidad en la diferenciación de la cepa camélida (G6) de las cepas G1, G2 y G7. A través de la amplificación con la PCR fue posible realizar un rastreo rápido de muestras obtenidas de diferentes zonas geográficas y de distintos huéspedes para evaluar la presencia de G6 por la amplificación de una banda específica que es perfectamente diferenciable a la observada para los aislamientos de G1, G2 y G7 (11, 12, 13).

La estrategia utilizada para asignar las cepas infectivas en Argentina fue el análisis por los métodos moleculares de PCR-RFLP del ITS1 de los genes ribosomales y a la secuenciación parcial del gen mitocondrial COI. Identificándose tres sub-especies infectivas en la Argentina que desarrollan tres ciclos de vida diferentes comprendiendo a los porcinos, los bovinos, los ovinos y las cabras, como huéspedes intermediarios (6, 7, 8, 12, 49, 57, 58).

Otros estudios han evaluado la distribución de los diferentes genotipos en diferentes zonas geográficas. En Argentina se realizó un estudio en que la zona pampa fértil, región con aptitudes para el desarrollo de ganado bovino y porcino en especial, se encontró la cepa porcina (G7) en muestras provenientes de cerdos y de bovinos y la cepa camélida (G6) identificada en los aislamientos de cabra, si bien debe destacarse que no existen en este país camélidos como animales autóctonos, se cree que probablemente los reservorios de esta variedad sean las llamas, vicuñas y guanacos de la cordillera central. La variedad ovina (G1) fue identificada en las muestras provenientes de todos los aislamientos de quistes hidatídicos humanos y ovinos de todo el país (11, 12, 13).

Además otras investigaciones realizadas igualmente en Argentina que profundizaron los estudios sobre *E. granulosus* debido a la gran cantidad de variantes genéticas, analizaron la variabilidad entre y dentro de esta especie utilizando el gen COI, NDI y ITS1, confirmando la presencia de las cepas G1, G2, G6 y G7 donde igualmente relacionan estrechamente a G1 con G2 y G6 con G7 y confirmaron la presencia de G6 por primera vez en aislamientos humanos dato que llamó la atención pues como anteriormente se manifestó el camello no es un animal habitual en Argentina. Especulándose una vez mas que esta cepa podría estar restringida a los camélidos sudamericanos (49); este dato tomó importante implicancia en salud pública para los programas de control de EQ en Irán donde la variedad G6 presenta una baja o nula infectividad a humanos en contraste a G1 cepa habitualmente reportada (64), lo que conduce a pensar que los camélidos representan un importante reservorio para infecciones humana (39).

Un estudio mas reciente en Argentina, reveló con el gen mitocondrial CO1 la existencia de 9 haplotipos, 5 de los cuales correspondían a genotipos distintos (G1, G2, G5, G6, G7), los 4 restantes presentaban menores diferencias con respecto a G1 y G7, esto condujo a la realización de un “network” de los haplotipos que resultó en 3 “subnetwork” independientes : 1 “subnetwork”: cepa bovina (G5); 2 “subnetwork” incluía a cepa camélida (G6) y 2 variantes de cepa porcina (G7a y G7b) y el 3 “subnetwork”: implicaba cepa ovina de Tasmania (G2) y cuatro variantes en la cepa ovina (G1, G1a, G1b y G1c), revelando que G1 presenta una gran variabilidad (25).

Algunos estudios realizados en el Perú, han pretendido realizar estudios morfométricos que definan variación intraespecífica de *E. granulosus* pero los resultados fueron infructuosos (3). Otros han detectado que existen diferencias en cuanto a la localización de los quistes hidatídicos de ovinos provenientes de las zonas andinas del Perú en los cuales se encuentran en un porcentaje mayor en pulmón a diferencia de los quistes encontrados en ovinos procedentes de diferentes países, como son Argentina, Chile y Uruguay que se encuentran en el hígado (44, 45). La localización de los quistes es una de las hipótesis y que esta se deba a alguna variación de la variedad que infecta a los ovinos, pero en la actualidad no contamos con estudios suficientes realizados a este nivel (3).

Santibáñez *et al.* (2008) realizó un estudio del DNA proveniente de 21 quistes de *E. granulosus* responsables de infección humana en Perú; usando el gen CO1 logró amplificar 20 muestras, revelando que la hidatidosis humana en este país esta básicamente restringida al genotipo G1 (cepa ovina) y que las medidas de control deben estar basadas en disminuir las tasas de infección en perros y ovinos por ser los principales protagonistas del ciclo biológico es esta cepa (51).

Todo este conocimiento indica que *E. granulosus* posee una variabilidad genética que le permitiría adaptarse a diferentes hospederos y ambientes geográficos, asimismo la presencia de más de una cepa en una misma zona tiene importancia en el control del parásito (23, 29, 39, 49), alguna de las cuales podría tener un impacto diferenciado en aspectos clínicos, de diagnóstico y para el tratamiento de animales y personas (48).

Dado que en la naturaleza el ciclo biológico de *E. granulosus* se ha extendido y establecido en diversos hospederos; lleva a pensar que en los países de América del sur especialmente Perú, el número de variantes intraespecíficas o genotipos presentes podría estar relacionado con el área geográfica y/o con las especies de explotación ganadera que se producen en cada lugar. En la actualidad, estas variantes genéticas o cepas están siendo identificadas por métodos cada vez más discriminativos (3).

III) OBJETIVOS

3.1 Objetivo General:

* Genotipificar aislados de *E. granulosus* procedentes de diferentes especies de rumiantes de cuatro departamentos pertenecientes a la Sierra central y Sur del Perú.

3.2 Objetivos Específicos:

* Estudiar la variabilidad intra-específica de *E. granulosus* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Polimorfismo de longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP).

* Establecer la relación filogenética de las cepas encontradas en el presente trabajo con otras reportadas en la literatura.

IV) MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Población en estudio

El estudio se realizó durante los años 2007 y 2008 y se recolectó un total 120 muestras de protoescolex (PSC) y/o membrana germinativa (MG) de quistes hidatídicos (QH) procedentes de hígado y pulmón de ovinos, bovinos y camélidos sudamericanos (llama y alpaca) infectados naturalmente y procedentes de camales oficiales de los departamentos de Ayacucho, Cuzco, Pasco y Puno pertenecientes a la sierra central y sur del Perú (Fig. 4). Las muestras fueron trasladadas a la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en Lima-Perú y/o laboratorio de enfermedades infecciosas de La Universidad Peruana Cayetano Heredia para su procesamiento.

4.2 Obtención y evaluación de muestras biológicas: Líquido, Protoescoleces y membrana germinativa de quistes hidatídicos

PSC y MG fueron aspirados y/o removidos de los quistes hidatídicos procedentes de hígado y/o pulmón de ovinos, bovinos y camélidos infectados, metodología similar a la realizada por Jenkins *et al.*, 1986 (28) y Verastegui *et al.*, 1992 (56) provenientes de los departamentos de Ayacucho, Cuzco, Pasco y Puno.

Para la obtención y evaluación de las muestras se tuvo en consideración que los quistes procedieran de vísceras frescas, las cuales fueron conservadas con refrigerantes y procesadas el mismo día.

El criterio para seleccionar los quistes para la obtención de las muestras fueron:

- Quistes con contenido líquido translúcido
- Presencia de arenilla hidatídica de rápida sedimentación.
- Se eliminaron aquellos quistes endurecidos y calcificados

Una vez evaluados físicamente, se desinfectaron externamente para la extracción de los PSC y MG. Conforme se extraía el líquido conteniendo los PSC se depositaba inmediatamente en un tubo falcón de 50 ml para su sedimentación.



Fig. 4 Mapa del Perú, señalando Ayacucho , Pasco, Cuzco y Puno departamentos de donde provinieron las muestras del presente estudio.

Luego se procedió a retirar el líquido sobrenadante para recuperar los PSC (sedimento). Independientemente de los QH se separó la MG. Las muestras de PSC y MG fueron resuspendidas en 0,7 ml de etanol absoluto y guardado a -20°. Se procedió de esta manera para cada uno de los quistes

4.3 Extracción de DNA

Las muestras biológicas fueron procesadas usando el procedimiento estándar publicado por Sambrook *et al.*, en 1989 (50) y consistió inicialmente en tres lavados con buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 50 mM, pH 8,0; SDS 0,5%), después se le agregó 50 µl de proteinasa K (20 mg/ml), incubándose de las muestras por 2 horas a 56°C. La extracción de DNA se efectuó con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1) y la precipitación del DNA con etanol absoluto y acetato de amonio 3M pH 5,2. Las muestras de DNA obtenidas fueron resuspendidas en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1mM) y almacenadas a una temperatura de 20°C. Se realizó la cuantificación del contenido de DNA de cada muestra.

4.4 Nested – PCR

La reacción en cadena de la polimerasa más conocida como PCR, es una técnica que permite replicar entre cientos de miles y millones de veces en el transcurrir de pocas horas *in vitro* pequeñas cantidades de DNA. El Nested PCR, es una variación del PCR en el cual se realiza dos PCR consecutivos para aumentar la especificidad y sensibilidad de la prueba. Para el presente estudio se amplificó un segmento del ITS1 del DNA ribosómico 18S₂ específico para *E. granulosus* (Fig 5). Los “*primers*”: utilizados y la condiciones seguidas fueron las empleadas por Rahimii *et al.*, 2007 (48).

Características de los “*primers*”:

Los “*primers*” seleccionados para el presente trabajo, fueron diseñados por 48., a partir de la secuencia de nucleótidos de 30 aislados de *E. granulosus* en base al segmento del ITS1 del DNA ribosómico 18S, extraídos del Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) a través de Internet (Tabla 2).

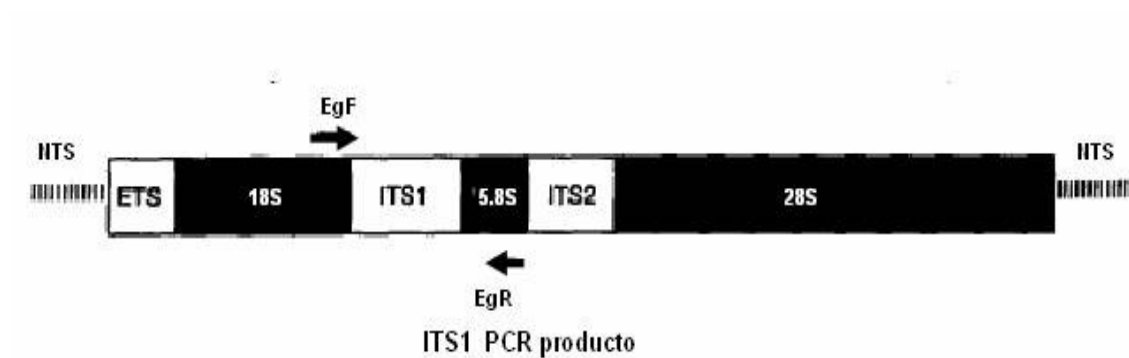


Fig 5 Estructura del DNA ribosomal que muestra las posiciones donde los primer son asignados durante el “annealing” del PCR

Fuente: Modificación a partir de Bowles J. and McManus D. 199. Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction based RFLP Method. Molecular Biochem. Parasitology. .

Primeros “primers”(Outer) fueron:

Forward 1 (EGF): 5'- CCA AAC TTG ATC ATT TAG AGG AAG - 3'

Reverse 1(EGR): 5'- TAT GGG CCA AAT TCA CTC ATT ACC -3'

Las condiciones para realizar el PCR fueron las siguientes: 10mM de Tris HCl, 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 0,25 µM de cada primer, 0,3 unidades de *Taq* polimerasa (Invitrogen, life Technologies) y 10 ng de DNA. La reacción tuvo un volumen final de 50 µl.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: ciclo inicial de denaturación a 95 °C durante 6 min, seguido por 30 ciclos de denaturación a 95 °C durante 45 seg, alineamiento a 55 °C durante 1 min 30 seg y extensión a 72°C durante 2min, seguidos por un ciclo final de extensión a 72 °C durante 5 min. Con estos “*primers*” se esperó la amplificación de un fragmento de 1800 pb.

Segundo “primers”(inner) fueron:

Forward 2(EgF): 5'- GTC GTA ACA AGG TTT CCG TA GG -3'

Reverse 2(EgR): 5'- TAG ATG CGT TCG AAG TGT CG -3'

Las condiciones del Nested-PCR para detectar *E. granulosus* fueron las siguientes: 10mM de Tris HCl, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 0,25 µM de cada primer, 0,1 unidades de *Taq* polimerasa (Invitrogen, Life Technologies) . La reacción tuvo un volumen final de 75 µl.

Las condiciones de amplificación fueron : ciclo inicial de denaturación a 94 °C durante 3 min, seguido por 35 ciclos de denaturación a 94 °C durante 45seg, alineamiento a 62 °C durante 45 seg y extensión a 72°C durante 45 seg, seguido por un ciclo final de extensión a 72 °C durante 5 min. Con estos “*primers*” se esperó la amplificación de un fragmento de aproximadamente 1000 pb.

Tabla 2. Características de los 30 aislados de *E. granulosus* extraídos del Genbank para el diseño de los “primers”.

No.	Cepa	No. Nucleótidos	No. Accesión	No.	Cepa	No. Nucleótido	No. Accesión
1	EG 13.2	953	AJ245630	16	33	965	AJ237826
2	EG 13.2	953	AJ245929	17	33	975	AJ237825
3	EG13.2	957	AJ245928	18	33	977	AJ237824
4	174	979	AJ237838	19	33	952	AJ237823
5	174	984	AJ237837	20	33	976	AJ237822
6	7	986	AJ237836	21	G8	984	AJ237821
7	7	840	AJ237835	22	G8	974	AJ237784
8	44	990	AJ237834	23	G8	982	AJ237783
9	41	964	AJ237833	24	G8	965	AJ237782
10	41	970	AJ237832	25	G8	957	AJ237781
11	33	967	AJ237831	26	G1	904	AJ237777
12	33	936	AJ237830	27	G6	964	AJ237776
13	33	990	AJ237829	28	G6	1045	AJ237775
14	33	996	AJ237828	29	G5	1024	AJ237774
15	33	986	AJ237827	30	G4	1023	AJ237773

Fuente: Rahimi H., Kia E., Mirhendi S., Talebi A., Fasihi Harandi M., Jalali-zand N. and Rokni M. A new primer pair in ITS1 Region for molecular studies on *Echinococcus granulosus*. Iranian Journal Public Health. 2007

Para todas las amplificaciones se utilizó un termociclador (PT-100 MJReserch). Luego de la amplificaciones obtenidas, se tomaron 5 µL de los productos de reacción y se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% suplementado con 3 µL de bromuro de etidio (10 mg/ml).

La visualización de las bandas se realizó bajo luz ultravioleta utilizando el sistema digital de análisis.

4.5 Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP- PCR)

Los productos amplificados con el segundo par de “*primers*”(inner) de la regiones ITS1, fueron digeridos con las enzimas *Msp I*, *Alu I*, *Taq I* y *Rsa I* (Promega). Cada reacción consistió de 3 µl de buffer 10X de enzima, 0,1 µl de cada enzima, 7 µl de producto de Nested-PCR y 12 µl de agua PCR ; incubándose a 37 °C por 5 horas, excepto para la enzima *Taq I* que fue 56 °C por 5 horas, tal como lo indican la especificaciones del fabricante.

Para cada patrón de restricción se determinó el número de bandas generadas y su tamaño aproximado por comparación con el marcador de peso molecular 100 pb DNA *ladder* (Invitrogen). Con las secuencias depositadas en el Genbank de las regiones ITS1 del DNAr de las distintas cepas de *E. granulosus* se realizó un análisis de restricción virtual mediante el *software* *Webcutter* 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2>), que busca los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción sobre las distintas cepas en una base de datos que contiene todas las enzimas de restricción comerciales.

Para la ejecución de las técnicas moleculares antes mencionadas se utilizó 3 ambientes exclusivos, distantes uno del otro, un primer ambiente de recepción y procesamiento de muestras, el segundo de preparación de reactivos y ciclamiento finalmente un ambiente para las corridas electroforéticas. La manera como se trabajó fue en esa secuencia, es decir que se extraía el DNA, se realizaba el Nested-PCR y finalmente se corría en geles, en los cuales siempre se colocaron controles positivos y

negativos. Por consiguiente en cada uno de ellos se utilizaron materiales propios del área como fueron; micropipetas, tubos, equipos y otros.

El 100 % de las muestras fueron procesadas dos veces con la finalidad de evaluar reproducibilidad del resultado.

4.6 Visualización de los productos de PCR.

Todos los productos de amplificación generados por el Nested - PCR y RFLP-PCR fueron mezclados con rojo de cresol (1ng/ µl) en proporción 5 :1 antes de ser colocados en los geles de agarosa conteniendo 0.05 mg de Bromuro de Etidio (Sigma Chemical CO) y sometidos a electroforesis por 45 min a 90V.

Los geles de agarosa utilizados para todos los productos de amplificación por el Nested – PCR fueron al 1,5% excepto para los productos generados por el RFLP-PCR con las diferentes enzimas, en los cuales se utilizó geles de agarosa al 2% (Invitrogen, Life Technologies). Las bandas fueron observadas por luz ultravioleta y digitalizadas en fotos.

4.7 Secuenciamiento

Adicionalmente a la confirmación de los productos generados por el Nested-PCR, cinco productos por duplicado fueron purificados a partir de gel de agarosa de bajo punto de fusión (Promega , Madison, EEUU), 30 µl del producto de PCR- Nested fue corrido en dicho gel a 70 V durante 60 minutos. Las bandas de DNA (bandas únicas) correspondientes al ITS1 se extrajeron usando laminillas cubreobjetos estériles cortando las porciones de agarosa que contenían la banda amplificada, los cuales fueron colocados en tubos de 1,5 ml. El DNA fue liberado del gel utilizando el Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante. Los productos de amplificación correspondientes al ITS1 se almacenaron a -20 °C y se usaron para la confirmación de RFLP-PCR y para secuenciamiento. Para el secuenciamiento, las muestras fueron enviadas a la compañía MacroGen. Las secuencias obtenidas fueron editadas con ayuda del programa BioEdit Sequence

Alignment Edit BioEdit.7.0.1. (Bioedit 7.0.1) y comparadas con la base de datos del Genbank.

4.8 Análisis de Datos

4.8.1 Identificación de Patrones:

Los patrones moleculares tanto el Nested-PCR y RFLP-PCR obtenidos de las muestras fue determinado empleando el Software DNA ProScan's Pro-Score versión 2.39, que realiza un calculo automático del tamaño de cada banda de DNA de la muestra problema en base a su coeficiente de migración (Rf) y el tamaño del marcador utilizado (100 pb DNA ladder, Invitrogen). Para la determinación de los patrones fue necesario una base de datos (software: Excel) en el cual se preparo una base binomial de presencia y ausencia de bandas .

4.8.2 Alineamiento de secuencias obtenidas

a. Búsqueda y Reporte de secuencias en el Genbank.

Con la finalidad de construir un árbol filogenético y del cual se puedan realizar inferencias filogenéticas mas confiables, se procedió a obtener secuencias parciales del gen rRNA 18S (parcial) y rRNA 5.8S (parcial) y el espaciador transcrito interno1 (ITS1) de las diferentes cepas de *E. granulosus* y especies similares y géneros no relacionados depositadas en Internet en el Genbank.

b. Alineamiento de secuencias.

Las secuencias usadas fueron verificadas en el Genbank mediante el BLAST 2.0 (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI, y alineadas por los programas bioinformáticos Clustal W y BioEdit.7.0.1. Para el alineamiento se utilizaron secuencias parciales del gen rRNA 18S (parcial) and rRNA 5.8S (parcial) e ITS1 de 35 especies de *Echinococcus*, 4 *Taenias spp* como parásitos relacionados y como grupo externo a *Plasmodium Vivax*. Las especies para el análisis se muestran en la tabla 3.

Tabla 3 Hospedero y origen geográfico de los aislados de *Echinococcus granulosus* usados como material referencial extraídos del Genbank

No.	Especie	Geno tipo	Origen	Hospedero	Clon	No. Accesion GenBank	Referencia
1	<i>E. granulosus</i>		Peru	Ovino			En estudio
2	<i>E. granulosus</i>		Peru	Ovino			En estudio
3	<i>E. granulosus</i>		Peru	Ovino			En estudio
4	<i>E. granulosus</i>		Peru	Ovino			En estudio
5	<i>E. granulosus</i>		Peru	Alpaca			En estudio
6	<i>E. granulosus</i>	G1	United Kingdom	Ovino		AF132694	Van Herwerden L. y Gasser R. (2000)
7	<i>E. granulosus</i>	G1	Falkland Islands (Islas Malvinas)	Ovino		AF132695	Van Herwerden L. y Gasser R. (2000)
8	<i>E. granulosus</i>	G1	Falkland Islands (Islas Malvinas)	Ovino		AF132696	Van Herwerden L. y Gasser R. (2000)
9	<i>E. granulosus</i>	G1	Falkland Islands (Islas Malvinas)	Ovino		AF132697	Van Herwerden L. y Gasser R. (2000)
10	<i>E. granulosus</i>	G1	Falkland Islands (Islas Malvinas)	ovino		AF132698	Van Herwerden L. y Gasser R. (2000)
11	<i>E. granulosus</i>	G1	Falkland Islands (Islas Malvinas)	ovino		AF132699	Van Herwerden L. y Gasser R. (2000)
12	<i>E. granulosus</i>	G1	Falkland Islands (Islas Malvinas)	ovino		AF136700	Van Herwerden L. y Gasser R. (2000)
13	<i>E. granulosus</i>	G1	Falkland Islands (Islas Malvinas)	ovino		AF132701	Van Herwerden L. y Gasser R. (2000)
14	<i>E. granulosus</i>	G1	NR	Camello	S	AJ237777	Bowles J., Blair D. y McManus D. (1993)
15	<i>E. granulosus</i>	G4	Europa	Caballo		AJ237773	Bowles J., Blair D. y McManus D. (1993)
16	<i>E. granulosus</i>	G5	Europa, India	Bovino		AJ237774	Bowles J., Blair D. y McManus D. (1993)
17	<i>E. granulosus</i>	G6	Sudan	Camello	L	AJ237775	Bowles J., Blair D. y McManus D. (1993)
18	<i>E. granulosus</i>	G6	Somalia	Camello	S	AJ237776	Bowles J., Blair D. y McManus D. (1993)
19	<i>E. granulosus</i>	G7	Eslavakia	Cerdo		AJ237821	Kedra A., y col. 1999
20	<i>E. granulosus</i>	G7	Eslavakia	Cerdo		AJ237822	Kedra A., y col. 1999
21	<i>E. granulosus</i>	G7	Eslavakia	Cerdo		AJ237823	Kedra A., y col. 1999
22	<i>E. granulosus</i>	G7	Eslavakia	Cerdo		AJ237824	Kedra A., y col. 1999
23	<i>E. granulosus</i>	G7	Eslavakia	Cerdo		AJ237825	Kedra A., y col. 1999
24	<i>E. granulosus</i>	G7	Polonia	Cerdo		AJ237834	Kedra A., y col. 1999
25	<i>E. granulosus</i>	G8	USA	Cérvido		AJ237783	Bowles J., Blair D. y McManus D. (1993)
26	<i>E. granulosus</i>	G8	USA	Cérvido		AJ237784	Bowles J., Blair D. y McManus D. (1993)
27	<i>E. granulosus</i>	G8	Canada	Elk		DQ144046	Thompson R. y Col (2005)
28	<i>E. granulosus</i>	G8	Canada	Elk		DQ144047	Thompson R. y Col (2005)
29	<i>E. granulosus</i>	G10	Canada	Roedor		DQ144042	Thompson R. y Col (2005)
30	<i>E. granulosus</i>	G10	USA	Roedor		DQ144043	Thompson R. y Col (2005)
31	<i>E. granulosus</i>	G10	Canada	Elk		DQ144044	Thompson R. y Col (2005)
32	<i>E. granulosus</i>	G10	Canada	Elk		DQ144045	Thompson R. y Col (2005)
33	<i>E. multicularis</i>		Alaska	Humano	L	AJ237778	Bowles J., Blair D. y McManus D. (1993)
34	<i>E. oligarthus</i>		Panama		L	AJ237779	Bowles J., Blair D. y McManus D. (1993)
35	<i>E. vogeli</i>		Sur de America			AJ237780	Bowles J., Blair D. y McManus D. (1993)
36	<i>T. solium</i>		India	Cerdo		EF090614	Base de datos del GenBank
37	<i>T. saginata</i>	NR		NR		AY392045	Base de datos del GenBank
38	<i>T. asiatica</i>	NR		NR		AY392046	Base de datos del GenBank
39	<i>T. taeniforme</i>	NR		NR		EU051351	Base de datos del GenBank
40	<i>P. vivax</i>	NR		NR		PVU93095	Base de datos del GenBank

NR: No reportado

4.8.3 Análisis Filogenético

a. Polimorfismo del DNA

Para el cálculo de los siguientes parámetros H o diversidad haplotípica, diversidad nucleotídica, los estadísticos D de Tajima (Tajima, 1989) y D de Fu y Li (Fu y Li, 1993) y el *mismatch distribution* se realizó mediante los programas bioinformáticos MEGA versión 4.0.2 y:DNA Sequence Polimorphys - versión 3.14. (DNASP vs. 3.14).

b. Análisis mediante el algoritmo de Neighbor-Joining (NJ)

Este análisis se realizó en el programa MEGA versión 4.0.2, Se generó un árbol filogenético y la robustez de las ramas generadas se obtuvo mediante el método de *bootstrap*. El modelo utilizado para calcular la distancia entre las secuencias ha sido el modelo de sustitución nucleotídica de Tamura – Nei.

c. Análisis de Máxima Parsimonia.

Para generar un árbol filogenético por máxima parsimonia se usó el nivel 1 de la opción *close-neighbor-interchange* (CNI, por sus siglas en inglés) con una adición aleatoria para árboles de 10 réplicas. Este análisis se realizó en el programa MEGA versión 4.0.2, la robustez de las ramas generadas se obtuvo mediante el método de *bootstrap*.

d. Análisis filogenético por network

Para establecer conexiones en red (*median joining networks*) y visualizar gráficamente las relaciones filogenéticas entre los haplotipos. Se utilizó el programa bioinformático *Network* versión 4.5.0.1.

V RESULTADOS:

5.1 Extracción del DNA

Las 120 muestras colectadas, fueron incluidas en el estudio. Cada una fue procesada individualmente y se necesitó 20 - 30 mg de PSC o MG para extraer DNA. El DNA obtenido de todas las muestras fue cuantificado usando un marcador de peso molecular (Lambda DNA. INVITROGEN, Life Technologies) y DNA, cantidades entre 10 y 20 ng de DNA en 5 µl fueron suficientes para realizar el Nested – PCR.

5.2 Control de calidad del Nested – PCR

Se seleccionaron 30 muestras de diferentes zonas, para ser trabajadas en un estudio piloto utilizando los “primers” para PCR diseñados por Bowles & McManus en 1993 (*BDI*, 5'- *GTC GTA ACA AGG TTT CCG TA* -3'; *4S*, 5'- *TC TAG ATG CGT TCG AA(G/A) TGT CG ATG* -3') (6) que generó productos de amplificación de 1056 pb y 849 pb y los “primers” para Nested-PCR diseñados por Rahimii *et al.* en el 2007 (*EGF*, 5'- *CCA AAC TTG ATC ATT TAG AGG AAG* - 3'; *EGR* 5'- *TAT GGG CCA AAT TCA CTC ATT ACC* -3; *EgF* 5'- *GTC GTA ACA AGG TTT CCG TA GG* -3'; (*EgR* 5'- *TAG ATG CGT TCG AAG TGT CG* - 3')) (48) que generó para el primer par de “primers” un fragmento de 1800 pb para todas las muestras y para el segundo par de “primers” generó productos de amplificación de 1056 pb y 849 pb (Fig. 6) similares a los “primers” diseñados por Bowles & McManus.

Se eligió trabajar con el Nested-PCR por ser más sensibles ya que logró amplificar el 100% de las muestras, lo que no ocurrió con los otros “primers” cuyo porcentaje fue menor.

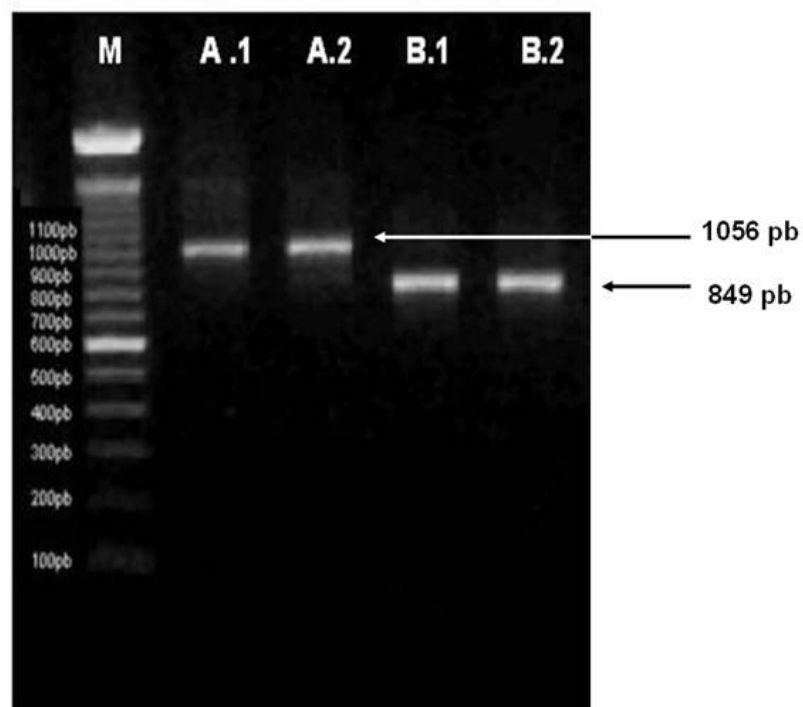


Fig. 6 Tamaños obtenidos de los productos amplificados de *E. granulosus* :
A: Patrón de 1056 pb; **B:** Patrón de 849 pb; **1:** Utilizando los "primers" diseñados por Bowles J. y McManus D (1993); **2:** Utilizando los "primers" diseñados por Rahimii (2007) y **M:** Marcador de 100 pb.

5.3 Nested – PCR

De las 120 muestras procesadas: 20 de ayacucho, 41 de Cuzco, 18 de Pasco y 41 de Puno y procesadas por Nested – PCR, se logró amplificar para el primer par de “*primers*” un fragmento de 1800 pb para todas las muestras; para el segundo par de “*primers*” se generó 2 productos de amplificación: el 5,8% (7/120) de las muestras amplificó un fragmento de 849 pb y el 94.2% (113/120) de 1056 pb, a los que desde un inicio denominamos patrón A y B respectivamente y luego fueron del RFLP-PCR fueron confirmados. Igualmente se amplificó a *Taenia solium*, *T. saginata* y *T. multiceps* usando estos “*primers*” generando para todas estas especies un producto final de 812 pb. (Tabla 4, fig. 7, anexo 1).

El patrón A fue el que predominó, en tanto que el patrón B fue de menor predominancia. Para hallar la reproducibilidad de los resultados, las muestras se procesaron tres veces.

5.4 Identificación de Patrones por Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP)

Todos los productos finales de las 113 muestras donde se amplificó un fragmento de 1056 pb por el Nested – PCR se realizó el RFLP-PCR con diferentes enzimas: *Msp I*, *Alu I*, *Rsa I* y *Taq I*, encontrándose para todos los productos similitud en las bandas generadas para cada enzima: *Msp I*: Bandas de 293 y 693 pb. (Fig. 8; anexo 2); *Alu I*: Bandas de 282 y 716 pb (Fig. 9, anexo 3); *Rsa I*: Bandas de 307 y 672 pb (Fig. 10, anexo 4); *Taq I*: Banda de 1020 pb. (Fig. 11, anexo 5). Como todos los productos digeridos con cada enzima generó un mismo perfil genético y se siguió denominando patrón A.

Para todos los productos finales de las 7 muestras donde se amplificó un fragmento de 849 pb por el Nested – PCR igualmente se realizó el RFLP-PCR con diferentes enzimas: *Msp I*, *Alu I*, *Rsa I* y *Taq I*, encontrándose para todos los productos similitud en las bandas generadas para cada enzima: *Msp I*: Bandas de

Tabla 4. Distribución por departamentos de los patrones observados con el marcador ITS1 para *Echinococcus granulosus*

PROCEDENCIA	PATRON A 1056 pb	PATRON B 849 pb	TOTAL
AYACUCHO	20	0	20 (16,67%)
CUZCO	41	0	41 (34,17%)
PUNO	35	6	41 (34,17%)
PASCO	17	1	18 (15,00%)
TOTAL	113 (94,17%)	7 (5,83%)	120 (100%)

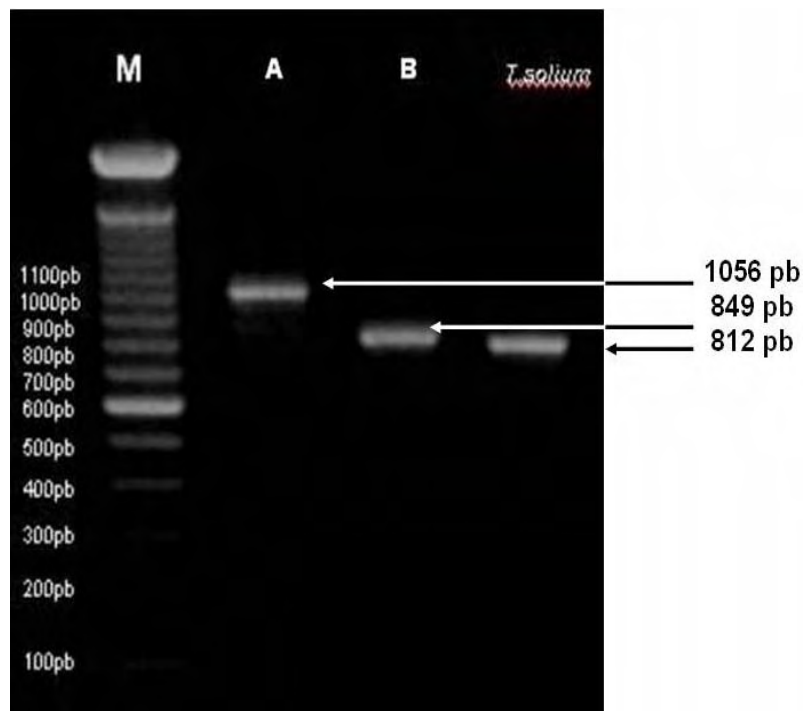


Fig 7. Tamaños obtenidos de los productos amplificados de *E. granulosus* generados por el Nested - PCR: A: Patrón de 1056 pb; B: Patrón de 849 pb; M: Marcador de 100 pb. y *T. solium* (812 pb).

321 y 486 pb. (Fig. 8, anexo 2); *Alu I*: Banda de 816 pb (Fig. 9, anexo 3); *Rsa I*: Bandas de 357 y 428pb (Fig. 10, anexo 4); *Taq I*: Bandas de 215 y 528 pb. (Fig. 11, anexo 5). Como todos los productos digeridos con cada enzima generó un mismo perfil genético y se siguió denominando patrón B.

Para la determinación de los patrones, se analizó el perfil de bandas que generó cada enzima para cada aislamiento mediante el registro para presencia ("1") o ausencia ("0") de bandas de DNA de tamaño similar. El criterio utilizado para identificar una banda como polimórfica fue su presencia o ausencia en forma consistente en dos amplificaciones independientes. Estos resultados permitieron construir una base binomial que combinó todos los polimorfismos detectados en los aislamientos en estudio, con las 4 enzimas anteriormente descritas. Como para las 113 muestras con la banda de 1056 pb. (patrón A) y las 7 muestras con la banda de 849 pb. (patrón B), para cada enzima se generó un mismo perfil genético. Estos se siguieron denominándose patrón A y patrón B respectivamente.

La distribución de los patrones encontrados fue la siguiente: Para las muestras provenientes de Ayacucho (20 ovinos) y Cuzco (1 muestra de ovino, 2 de llamas y 38 de bovinos) fue similar, ambos arrojaron un solo perfil al que denominamos patrón A, reflejado en una banda de 1056 pb. Para las muestras provenientes de Puno (9 muestras de alpacas y 32 de ovinos) y Pasco (9 muestras de ovinos y 9 de bovinos) encontrándose dos perfil: uno perteneciente al patrón A y el segundo un perfil reflejado en una banda de 849 pb. al que denominamos patrón B. Para Puno de las 9 muestras de alpacas, 6 presentaron el patrón B (849 pb) y 3 el patrón A (1056 pb) y de las 32 muestras de ovinos todas presentaron el patrón A. Para Pasco: De las 9 muestras de ovino, 1 presento el patrón B y 8 el patrón A y de las 9 muestras de bovinos, todas presentaron el patrón A (Tablas 5 y 6).

En los departamentos muestreados el patrón A fue el más predominante.

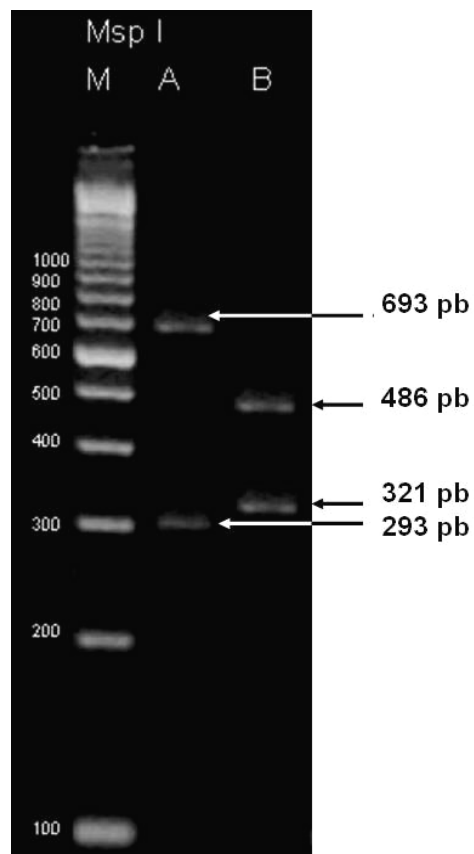


Fig. 8 Diferentes bandas obtenidas por digestión del producto de amplificación con la enzima *Msp I*: A: Patrón A (293 pb y 693 pb) y B: Patrón B (321 pb y 486 pb) y M: Marcador de 100 pb.

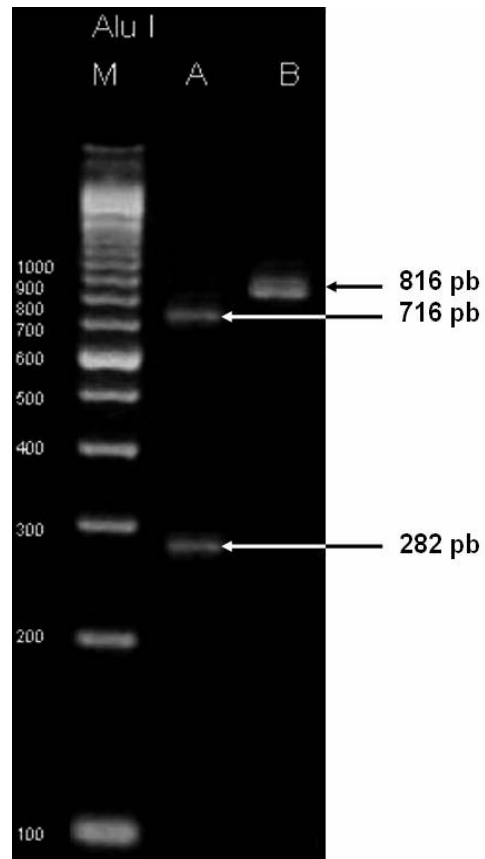


Fig. 9 Diferentes bandas obtenidas por digestión del producto de amplificación con la enzima *Alu I*: A: Patrón A (282 pb y 716 pb) y B: Patrón B (816 pb) y M: Marcador de 100 pb.

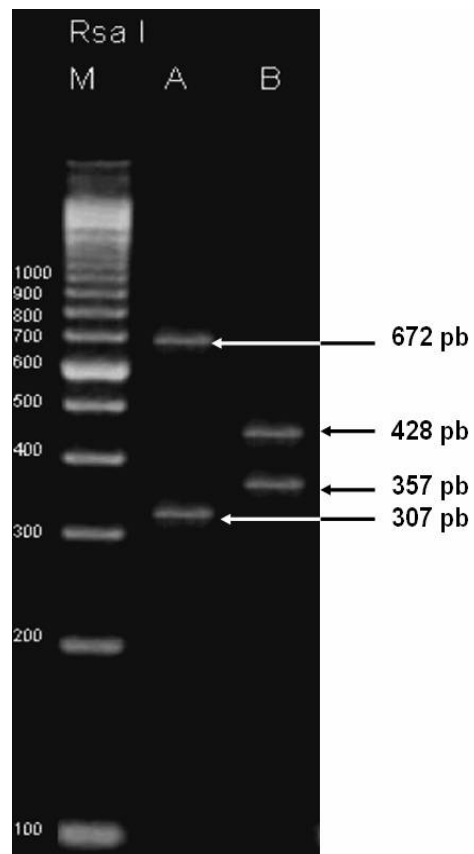


Fig. 10 Diferentes bandas obtenidas por digestión del producto de amplificación con la enzima *Rsa I*: A: Patrón A (307 pb y 672 pb) y B: Patrón B (357 pb y 428 pb) y M: Marcador de 100 pb.

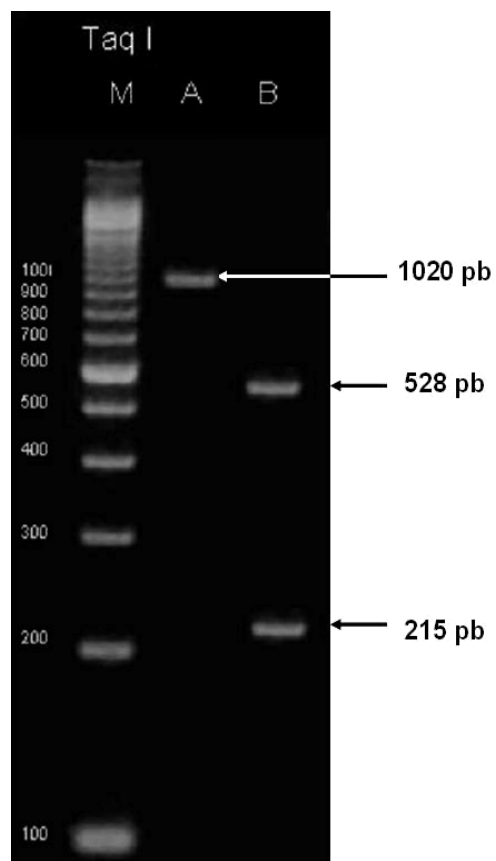


Fig. 11 Diferentes bandas obtenidas por digestión del producto de amplificación con la enzima *Taq I*: A: Patrón A (1020 pb) y B: Patrón B (215 pb y 528 pb) y M: Marcador de 100 pb.

Tabla 5. Distribución por departamentos vs hospedero intermediario del patrón A (1056 pb) observados con el marcador ITS1 de *Echinococcus granulosus*

PROCEDENCIA	OVINOS	LLAMAS	ALPACAS	BOVINOS	TOTAL
					20
AYACUCHO	20	0	0	0	(17,70%)
					41
CUZCO	1	2	0	38	(36,28%)
					35
PUNO	32	0	3	0	(30,98%)
					17
PASCO	8	0	0	9	(15,04%)
TOTAL	61	2	3	47	113(100%)

Tabla 6. Distribución por departamentos vs hospedero intermediario del patrón B (849 pb) observados con el marcador ITS1 de *Echinococcus granulosus*

PROCEDENCIA	OVINOS	LLAMAS	ALPACAS	BOVINOS	TOTAL
AYACUCHO	0	0	0	0	0
CUZCO	0	0	0	0	0
					6
PUNO	0	0	6	0	(85,71%)
					1
PASCO	1	0	0	0	(14,29%)
TOTAL	1	0	6	0	7 (100%)

5.5 Secuenciamiento:

El principal argumento para incluir el secuenciamiento en la metodología propuesta en el proyecto, es la confirmación de los resultados obtenidos por el RFLP's. Como para los patrones A y B el corte con enzima eran exactamente similares para cada uno, se seleccionaron 5 muestras: 3 muestras del patrón A y 2 muestras del patrón B y fueron enviadas a secuenciar a la compañía MacroGen (USA). Las secuencias obtenidas fueron editadas mediante el programa bioinformático BioEdit.7.0.1 y comparadas con la base de datos del *Genbank* para la observar la correspondencia y verificar el marcador amplificado.

5.6 Alineamiento de secuencias

Con la finalidad de construir un árbol filogenético, se obtuvieron secuencias parciales del gen rRNA 18S (parcial) y gen rRNA 5.8S (parcial) y espaciador transcrito interno 1 (ITS1) de las diferentes cepas de *E. granulosus* y especies similares y géneros nos relacionados reportadas en Internet en el *Genbank*, los cuales se alinearon entre si para la determinación de distancias genéticas y su filogenia. El tipo de análisis empleado fue el de búsqueda de similaridad, que consistió en efectuar una comparación de una secuencia problema con la totalidad de secuencias existentes en una base de datos. Esta búsqueda se realizó con distintos programas que aplican algoritmos de comparación y como resultado generaron un listado de los organismos cuyas secuencias resultan similares a las del estudio.

La obtención de las secuencias usadas se realizó en el Genbank con ayuda del BLAST. Para la creación y análisis de los árboles filogenéticos se utilizó 35 especies de *Echinococcus* (incluidas nuestras 5 muestras secuenciadas) y 4 de parásitos relacionados (*Taenias spp*) y como grupo externo: *Plasmodium vivax*. (Tabla 3). A partir de las secuencias obtenidas por MacroGen del presente estudio, mas las establecidas y depositadas en el Genbank, se obtuvo un alineamiento de 827 pb, usando los programas bioinformáticos: Clustal W y BioEdit.7.0.1.

5.7 Análisis Filogenético

5.7.1 Análisis mediante el algoritmo de Neighbor-Joining (NJ)

Con el alineamiento obtenido se construyó un árbol filogenético mediante en el algoritmo de NJ que se basa en la agrupación de las secuencias según el nivel de distancia. Se parte de un árbol en forma de estrella que no da ningún tipo de información, a partir de este y utilizando la matriz de distancia de las secuencias se van creando parejas que minimizan la distancia de sus ramas.

Este análisis se realizó el programa bioinformático MEGA versión 4.0.1, la robustez de las ramas generadas se obtuvo mediante el método de *bootstrap* a partir de 1000 pseudo replicas de las secuencias por remuestreo de las posiciones nucleotídicas. El modelo utilizado para calcular la distancia entre las secuencias ha sido el modelo de sustitución nucleotídica de Tamura – Nei .

La topología del árbol generado mediante NJ permitió visualizar 5 *cluster*: El primer *cluster* agrupa a los genotipos G5, G6 (clon L), G8 y G10. El segundo *cluster* agrupa a las especies *E. vogeli*, *E. oligarthus*, *E. multicularis* y G4, los dos últimos último agrupados en un sub-*cluster* (II B). El Tercer *cluster* agrupa a todas las G1 y a su vez las divide en 2 sub-*cluster* (III A-B), en uno de los cuales se incluye a nuestras secuencias del patrón A. El cuarto *cluster* agrupa a las cepas G6 (clon S), G7 y G8; el quinto *cluster* agrupa a nuestras dos secuenciadas pertenecientes al patrón B (Fig. 12).

Las especies pertenecientes a los géneros *Taenia* y *Plasmodium* se agrupan como grupos externos.

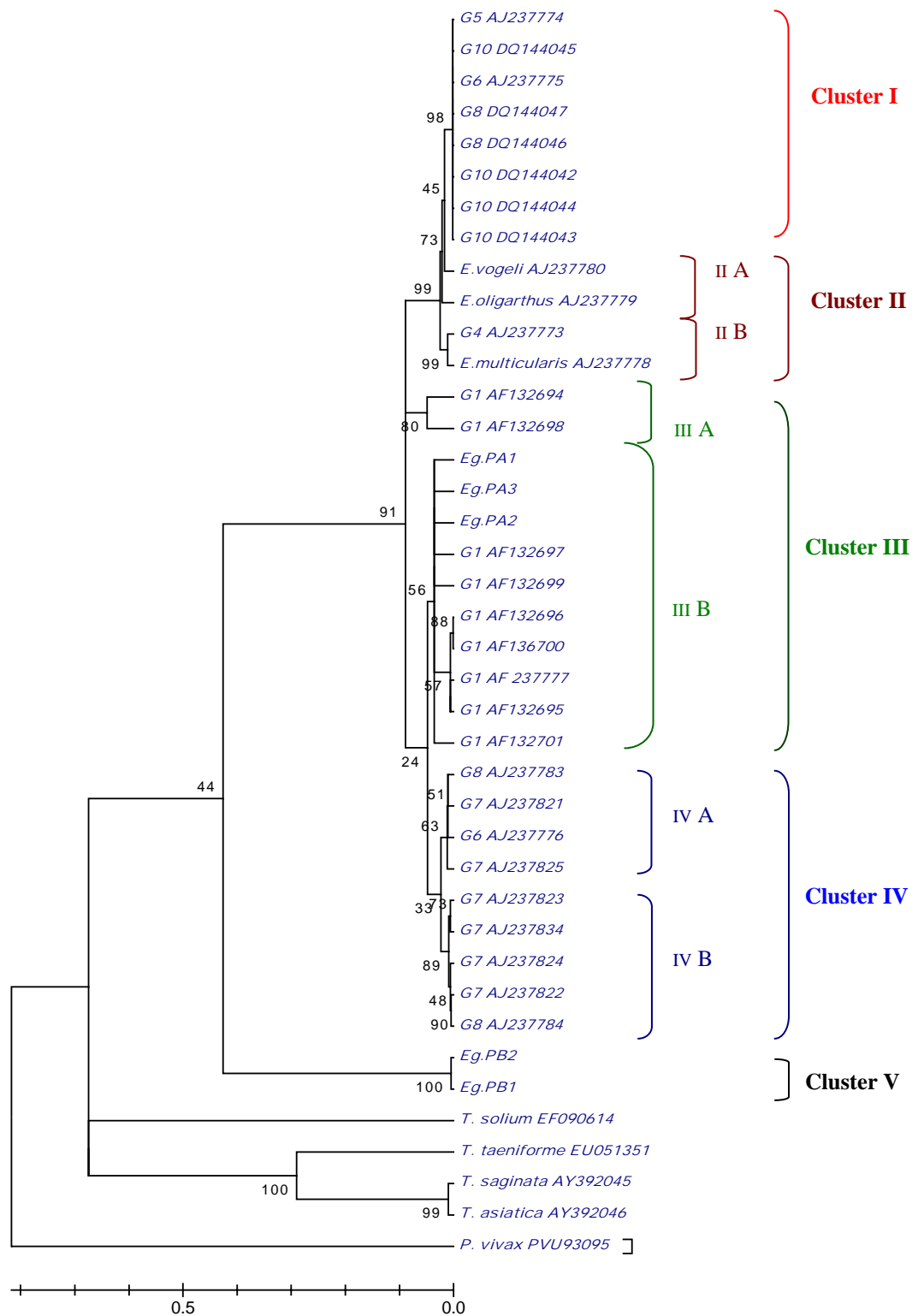


Fig 12. Análisis filogenéticos mediante el algoritmo de neighbor-joining para *E. granulosus* basados en la secuencia de la región ITS1 del DNA ribosomal, con valores bootstrap obtenidos a partir de 1.000 pseudorréplicas.

5.7.2 Análisis de Máxima Parsimonia (MP)

Con el alineamiento obtenido igualmente se construyó un árbol filogenético mediante en el algoritmo de MP. La construcción de un árbol mediante el método de MP considera cada posición nucleotídica como un carácter y genera una relación entre las secuencias teniendo en cuenta el mínimo número de pasos mutacionales necesarios para agrupar a todas. Para la realización de este análisis se utilizó un criterio heurístico, que es el sugerido cuando el número de secuencias es superior a 20 ya que el tiempo necesario para el análisis de parsimonia se vuelve enorme. La evaluación heurística disminuye el tiempo de cómputo. Para el árbol generado por MP se uso el nivel 1 de la opción *close-neighbor-interchange* (CNI, por sus siglas en inglés) con una adición aleatoria para árboles de 10 réplicas.

Este análisis se realizo en el programa MEGA versión 4.0.2, la robustez de las ramas generadas se obtuvo mediante el método de *bootstrap* a partir de 1000 pseudo replicas de las secuencias por remuestreo de las posiciones nucleotídicas.

La topología del árbol mediante MP permitió visualizar igualmente 5 *clusters* similares al generado por NJ. El primer *cluster* agrupa a los genotipos G5, G10, G6 clon L, G8 y G10. El segundo *Cluster* agrupa a las especies *E. vogeli*, *E. oligarthus*, *E multicularis* y G4, los dos ultimos un sub-*cluster* (II B). El Tercer *cluster* agrupa a todas las G1 y a su vez se sub divide en 3 sub-*cluster* (III A-C), en uno de los cuales se incluye las secuencias de nuestro patrón A. El cuarto *cluster* agrupa a las cepas G6 (clon S), G7 y G8 y el quinto *cluster* agrupa a nuestras dos secuenciadas pertenecientes al patrón B (Fig. 13).

Las especies pertenecientes a los géneros *Taenia* y *Plasmodium* se agrupan como grupos externos.

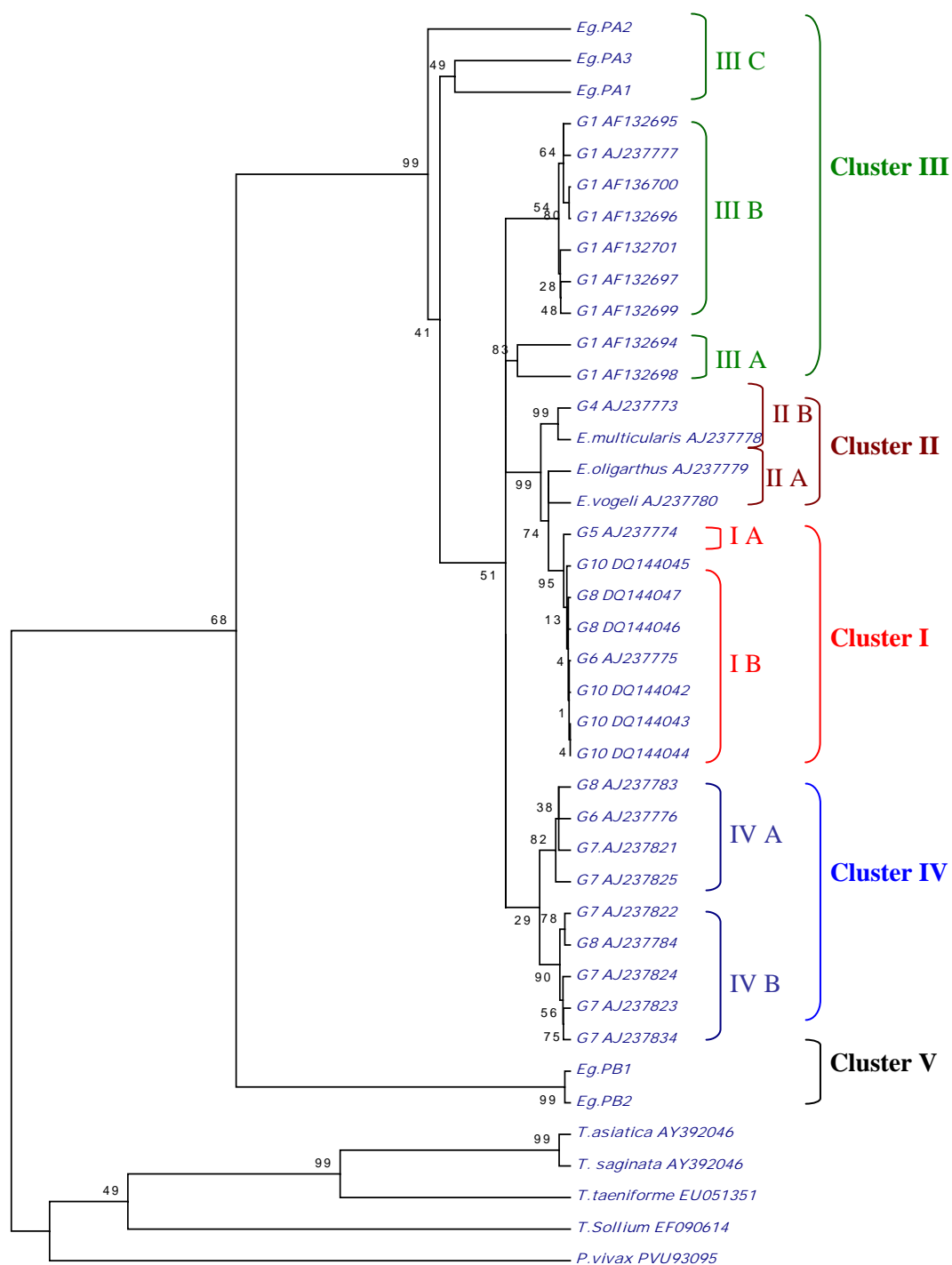


Fig 13. Análisis filogenéticos de *E. granulosus* basados en la secuencia de la región ITS1 del DNA ribosomal, con valores bootstrap obtenidos a partir de 1.000 pseudorréplicas. (A) Árbol de máxima parsimonia utilizando el programa MEGA

5.7.3 Polimorfismo del DNA

Los índices de variación nucleotídica, haplotípica, y Test de Tajima D' y Test Fu y $Li'sD^*$ fueron calculados mediante los programas bioinformáticos MEGA versión 4.0.2. y DNASP vs 3.14. La distribución del número de diferencias nucleotídicas de las secuencias va formando haplotipos (“*mismatch distribution*”) que fue calculado para estimar recientes expansiones demográficas. Con las 40 secuencias analizadas (35 de *Echinococcus* spp, 4 *Taenias* spp y 1 *Plasmodium vivax*, se generó un total de 37 haplotipos, de los cuales 32 corresponden a las distintas especies de *Echinococcus* spp utilizadas en el presente estudio y de estas 3 haplotipos representaban a *E. multicularis*, *E. vogeli* y *E. oligarthrus*, 28 haplotipos correspondían a secuencias individuales de diferentes cepas de *E. granulosus* y la restante agrupaba a 4 secuencias (Accesión: DQ144046, DQ14404 y DQ144044, DQ144045; pertenecientes a los genotipos G8 y G10 de *E. granulosus* respectivamente). Con los 32 haplotipos generados para *Echinococcus* spp se calculo: Diversidad nucleotídica Pi : 0,14725; Diversidad haplotípica: 0.990; Test de Tajima's D : -1.48814; y el Test Fu y $Li's D^*$: -0.60739

El análisis de “*mismatch distribution*” (promedio de diferencias a pares) construyó un histograma que describe la variación en la cantidad de diferencias nucleotídicas entre pares de haplotipos lo cual puede aportar información sobre la historia de las poblaciones de *Echinococcus* (Fig. 14).

Los picos indican la presencia de grupos divergentes de haplotipos posiblemente con diferentes orígenes genéticos. Este tipo de representación es adecuado para aquellos datos en los que se pueden computarse diferencias entre los diferentes haplotipos. Se ha demostrado que los episodios de crecimiento demográfico de declive o los cuellos de botella sufridos por una población dejan esta huella características en la distribución de las diferencias por parejas.

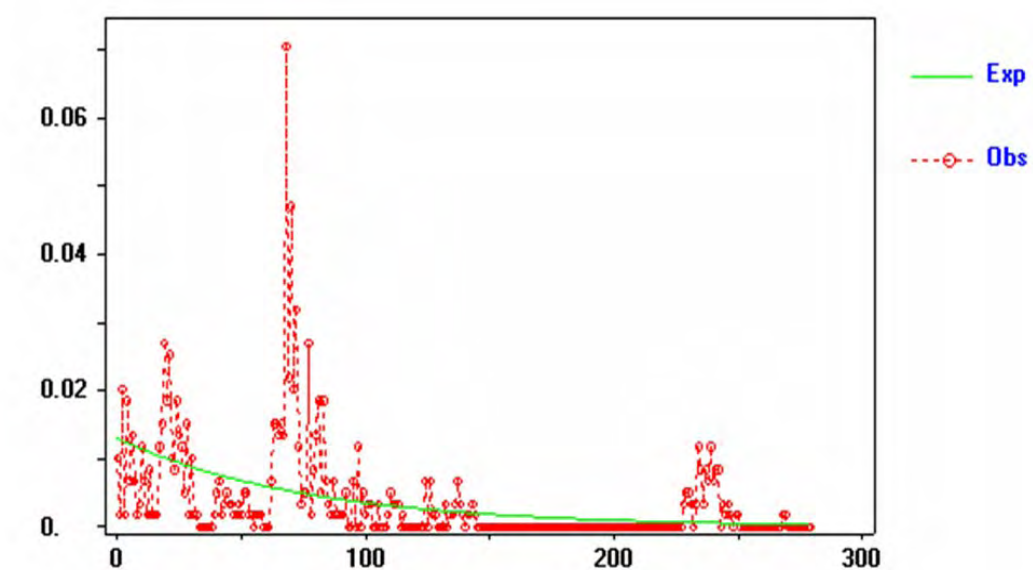


Fig. 14 “Mismatch distribution” obtenido mediante el programa DNASP 4.0 para los 32 haplotipos obtenidos de *Echinococcus* spp analizados en el presente estudio

5.7.4 Análisis filogenético por network

Para demostrar y visualizar las relaciones filogenéticas entre los distintos haplotipos se utilizó el programa *Network* versión 4.5.0.1 que estableció conexiones en red (*networks*) entre los haplotipos. Este método ha demostrado ser muy útil para visualizar relaciones filogenéticas porque muestra gráficamente toda la información contenida en los datos.

La topología del cladograma generado por el *networks* nos pudo orientar acerca de la historia demográfica de una población, las filogenias en forma de estrella con un haplogrupo central del que surgen varios haplotipos separados de este por pasos mutacionales, son signos de una expansión poblacional. Este patrón puede explicarse de la siguiente manera: Una determinada variante experimenta condiciones reproductivas favorables durante un largo periodo de tiempo y aumenta de frecuencia.

La topología del cladograma generado por el *networks* refleja los 5 *clusters* generados por NJ y MP. El primer *cluster* agrupa a los genotipos G5, G10, G6 (clon L), G8 y G10 y a su vez se divide en dos sub-*cluster* donde G5 independientemente genera un sub-*cluster* (IA). El segundo *Cluster* agrupa a las especies *E. vogeli*, *E. oligarthus*, *E. multicularis* y G4, este ultimo independiente forma el sub-*cluster* II B. El Tercer *cluster* agrupa a todas las G1 y a su vez se sub agrupa en 3 sub-*cluster*, nuestras tres secuenciadas pertenecientes al patrón A se incluyen el sub-*cluster* III C. El cuarto *cluster* agrupa a las cepas G6 (clon S), G7 y G8 y el quinto *cluster* agrupa a nuestras dos secuenciadas pertenecientes al patrón B (Fig. 15).

Las especies pertenecientes a los géneros *Taenia* y *Plasmodium* no fueron incluidas en el *networks* por ser especies genéticamente distantes o Grupos externos

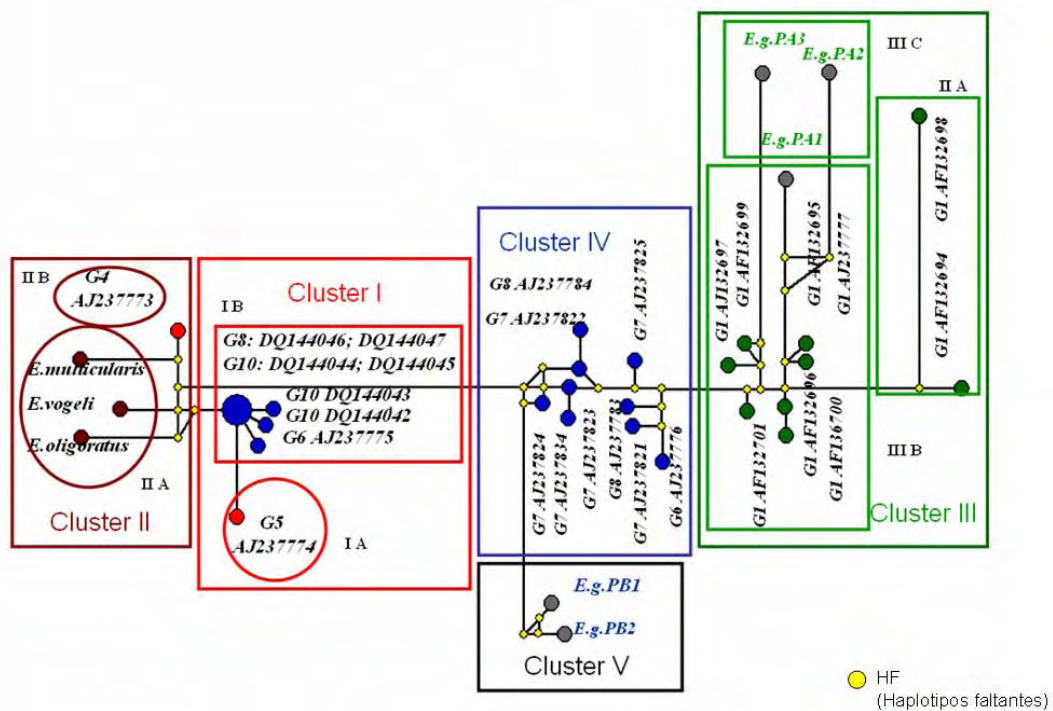


Fig. 15 Nested cladograma de *Echinococcus granulosus* generado por los haplotipos ITS1

El análisis de conexiones de red (*networks*) predijo los haplotipos que no están entre las muestras analizadas (HF) pero que pueden existir en la población o haber existido en el pasado confirmando los distintos orígenes.

También mostraron en la población de *Echinococcus granulosus* una estructura filogenética de estrella, teniendo en su centro el haplotipo más común. Este tipo de estructura poblacional se explica como una rápida expansión tras un proceso genético de cuello de botella, siendo en estos casos la diversidad nucleotídica y haplotípica baja tal como arrojan nuestros datos obtenidos. Para verificar si la población de *Echinococcus* spp. estuvo en expansión se llevaron a cabo los test de neutralidad.: Test de Tajima's D: -1.48814; y el Test Fu and Li's D*: -0.60739. Los índices negativos de los test indican un exceso de variantes en baja frecuencia, pudiendo esta baja frecuencia de mutaciones nuevas ser un indicador de expansión de la población. Asumiendo que todos los haplotipos encontrados son igualmente competentes, la expansión tiene importantes implicaciones en la epidemiología y tratamiento de la EQ.

VI DISCUSIÓN

La obtención de muestras biológicas para estudios de muchos céstodes como *E. granulosus* es un paso muy importante para lograr eficiencia y especificidad en la extracción de los ácidos nucleicos, pero obtener las mismas puede ser muy difícil, ya que su obtención muchas veces implica el sacrificio y posterior necropsia de los animales infectados, como el caso del presente estudio donde las muestra obtenidas de protoescolex y membrana germinativa de quistes hidatídicos proceden de hígado y pulmón de los animales sacrificados. Cuando se trata de obtener DNA es conveniente que provenga de muestras frescas y almacenadas en condiciones óptimas. La importancia de determinar los métodos adecuados para la obtención de muestras biológicas y extracción de DNA o material genético, radica en la posibilidad de un aprovechamiento completo de las mismas cuando estas son pequeñas.

En consideración a lo antes mencionado, el presente estudio para la obtención de muestras trabajo con la metodología publicada por Jenkins *et al.*, 1986 (28) y Verastegui *et al.*, 1992 (56) y para la extracción del DNA con el procedimiento estándar publicado por Sambrook *et al.*, 1989 (50), los cual ha sido utilizados por las múltiples investigaciones mencionadas en la presente, con resultados favorables. Así en nuestro estudio a partir de protoescolex y membrana germinativa de quistes hidatídicos igualmente se logro extraer DNA de las 120 muestras recolectadas y en concentraciones entre 10 y 20 ng de DNA en 5 µl, que fueron suficientes para realizar los ensayos moleculares. Estas técnicas, tiene una apropiada validez, situación que hace interesante intentar su reproducción en futuros estudios.

Con los ensayos moleculares se logro amplificar DNA de *E. granulosus*. Sin embargo inicialmente se presento ciertas dificultades con el empleo de la PCR convencional y el uso de los “*primers*” BD1 y 4S, antes utilizados en investigaciones publicadas como las de Bowles & McManus, 1993 (6) y Lavikainen *et al.*, 2003 (31); probablemente a que dichos “*primers*” en su

designación uso secuencias de *Schistosoma mansoni*, tal como lo reporta Thompson & McManus, 2002 (54). Dificultades que no acontecieron con el uso de los “primers” diseñados por Rahimii *et al.*, 2007 (48) basados estrictamente en secuencias de la región ITS 1 ribosomal de *E. granulosus*, los cuales por medio del Nested – PCR logro amplificar el 100% de muestras y los cuales difieren de los anteriores por la ausencia o presencia en sus extremos de 2 o 3 bases nucleotídicas.

Basados en los “primers” diseñados por Rahimii *et al.*, 2007 (48); el DNA de las 120 muestras recolectadas, fueron procesadas por Nested –PCR con la finalidad de obtener información de las posibles variantes existentes en la sierra central y sur del Perú. El Nested – PCR reveló que el 94.2 % (113/120) presento una banda de 1056 pb., compatible con otros grupos genéticos G1, G4, G5 y G6 reportados por Bowles & McManus, 1993 (6) y que el 5,8% (7/120) presenta una banda de 849 pb. aun no reportada (Tabla 4 y fig. 7).

Posteriormente empleamos el RFLP- PCR para ambos tipos de muestras. Si bien es cierto que el uso del RFLP - PCR usando una sola enzima de restricción no es siempre suficiente para la identificación categórica de un patrón, variedad o genotipo específico, esto se resuelve con la aplicación de 2 o mas enzimas de restricción y/o la ulterior secuenciación del DNA amplificado. Por ello en el presente estudio se trabajó con 4 enzimas (*Msp I*, *Alu I*, *Rsa I* y *Taq I*) favoreciendo el análisis y el establecimiento de los distintos patrones genéticos, obtuvimos dos perfiles genéticos a los que denominamos: Patrón A y Patrón B presentes en los rumiantes evaluados (ovinos, bovinos y camélidos sudamericanos) procedentes de los departamentos de Ayacucho, Cuzco, Pasco y Puno pertenecientes a la sierra central y sur del Perú (Tabla 5 – 6 y fig. 8 - 11).

Para determinar a que genotipo o cepa existente de *E. granulosus* pertenecen nuestros patrones, se tomaron 3 muestras del patrón A y 2 muestras del patrón B para su secuenciamiento . Para demostrar la relación filogenética entre las patrones A y B con respectos a las cepas ya caracterizadas; sus secuencias nucleotídicas obtenidas de la región ITS1, estas fueron alineadas junto a otras 27

secuencias similares de las cepas establecidas de *Echinococcus granulosus*, 3 de otras especies de *Echinococcus*, 4 de especies pertenecientes al género *Taenia* y 1 de *Plasmodium vivax*, depositadas en el Genbank, para posteriormente analizarlas mediante programas bioinformáticas que generan árboles filogenéticos cuya topología permitirá visualizar dicha relación.

Los resultados obtenidos contribuyeron afirmar que el patrón A corresponde al genotipo G1 o cepa ovina (Fig. 12 y 13). El 94.2 % de las muestras pertenecientes a los rumiantes evaluados procedentes distintos departamentos de la sierra central y sur del Perú presentaron el Genotipo G1. La existencia de G1 en el Perú se ve reforzado por un estudio anterior publicado este año por Santibáñez *et al.* (51) donde manifiesta que G1 es la cepa básicamente restringida a casos humanos en este país y que esta cepa se difunde naturalmente a través de un ciclo doméstico primario que comprende a los perros (*Canis familiaris*) y los ovinos (*Ovis aries*) y un ciclo doméstico secundario o alternativo que involucra al perro con los bovinos, caprinos y porcinos, lo que acondiciona a que sea la cepa mas frecuente en el hombre (1) y podría estar relacionada con las especies de crianza y explotación ganadera que se producen en cada lugar (3).

Nuestra serranía peruano no esta absuelta a esta realidad, pues gran parte de su economía y alimentación se basa en la crianza del ganado especialmente ovino y bovino y que esta asociada a la tenencia de perros como animales de pastoreo. Si a ello sumamos el escaso conocimiento sobre la transmisión de esta enfermedad, la falta de inspección sanitaria, el sacrificio clandestino de animales y la costumbre de eliminar las vísceras infectadas en lugares abiertos sin tratamiento previo alguno, son factores que proporcionan condiciones para la persistencia de esta parasitosis (30, 42, 44, 46).

Adicionalmente la presencia de los aislados de G1 en nuestro país demuestra y apoya una vez más que G1 es el cepa de mayor distribución geográfica en todo el mundo (1, 11, 12, 13, 33, 47, 64) y que a su vez presenta variabilidad tal como lo demostró Haag K. *et al.* en el 2004 (25) en Argentina al encontrar 9

haplotipos que incluía: 1: cepa ovina de Tasmania (G2); 2: cepa camélida (G6) y cepa porcina (G7); 3: cepa bovina (G5); 4-5: dos variantes en la cepa porcina (G7a y G7b) y 6 – 9: cuatro variantes en la cepa ovina (G1, G1a, G1b y G1c). Las cuales también podrían estar sujetas a la geografía de cada lugar, o sus hospederos involucrados en su ciclo biológico (3).

Todos estos datos tiene considerables implicancias en la toma de medidas en un programa de control en un país, ya que el tiempo de maduración del parásito depende del tipo de cepa o variedad que se trate (13).

En relación al Patrón B, si bien no podemos afirmar a que genotipo pertenece; una investigación futura más a fondo donde sea caracterizada junto a otras muestras usando otros marcadores resolvería esta interrogante. Es necesario mencionar que en 1999 se evidenció en Argentina la presencia 4 genotipos: G1 (cepa ovina), G2 (cepa ovina de Tasmania), G6 (cepa camélida) y G7 (cepa porcina), donde G6 resaltó por considerarse el primer reporte en humanos, hallazgo curioso pues el camello no es un animal habitual en Argentina, especulándose que esta cepa podría estar restringida a los camélidos sudamericanos (49). Motivo que nos lleva a pensar que el patrón B podría también podría estar asociado o restringido a nuestros camélidos sudamericanos y/o área geográfica determinada, debido a que 6 de las 7 muestras con dicho patrón procedían de alpacas provenientes del departamento de Puno, llamado también zona del altiplano del Perú (Tabla 6); en contraste al patrón A o G1 que tendría una amplia variedad de hospederos incluyendo camélidos sudamericanos, tal como lo demuestra nuestro estudio en el cual 3 muestras de alpaca provenientes también del departamento de Puno reportaron el patrón A (Tabla 5). Estos datos llamo nuestra atención ya que Xiao *et al.* (61, 62) manifestó que *E. shiquicus*, encontrado en zorros tibetanos de esta área y los cuales están adaptados solo a sobrevivir en altas altitudes, predican que la distribución de *E. shiquicus* estaría restringida a estas especies y a esta región geográfica localizada a aproximadamente 4000 msnm.

Se ha reconocido que *E. granulosus* posee un alto grado de diversidad genética con una amplia distribución geográfica en toda Sur América y el mundo (11, 12, 13, 25, 33, 47, 57, 58) por lo cual las variedades existentes en el Perú no serían ajenas a estas condiciones.

Con las 40 secuencias analizadas (35 de *Echinococcus* spp, 4 *Taenias* spp y 1 *Plasmodium vivax*, se generó un total de 37 haplotipos, de los cuales 32 corresponden a las distintas especies de *Echinococcus* spp, uno de los cuales agrupaba a 4 de las secuencias analizadas pertenecientes a G8 y G10. Para visualizar las relaciones filogenéticas entre los distintos haplotipos que estableció conexiones en red (*networks*) entre ellos. Originando una cladograma cuya topología presenta semejanza a las generadas por NJ y MP, reflejando los 5 *clusters*: El primer *cluster* agrupa a los genotipos G5, G10, G6 (clon L), G8 y G10. El segundo *Cluster* agrupa a las especies *E. vogeli*, *E. oligarthus*, *E. multicularis* y G4. El Tercer *cluster* agrupa a todas las G1 incluyendo a nuestras tres secuenciadas pertenecientes al patrón A. El cuarto *cluster* agrupa a las cepas G6 (clon S), G7 y G8 y el quinto *cluster* agrupa a nuestras dos secuenciadas pertenecientes al patrón B (Fig. 15).

El análisis de conexiones de red (*networks*) también predijo los haplotipos que no están entre las muestras analizadas (HF) pero que pudieron existir en la población o haber existido en el pasado confirmando los distintos orígenes. También mostró un haplotipo común a 4 secuencias de *E. granulosus* y del cual emerge 4 haplotipos nuevos, esto puede explicarse como una rápida expansión tras un proceso genético de cuello de botella, siendo en estos casos la diversidad nucleotídica y haplotípica baja, tal como arrojan nuestros resultados (Test de Tajima's D: -1.48814; y el Test Fu and Li's D*: -0.60739), donde los índices negativos son indicadores de expansión de la población.

En general, independientemente del patrón B, estos datos se ven reforzados con estudios anteriores utilizando diversos marcadores cuya topología de sus árboles generados presentan similitud a los nuestros. (25, 32, 37, 39, 49, 54).

Igualmente es necesario comentar que algunos de los estudios relacionados como los realizados por Bowles *et al.*, en 1992 y 1993 (5, 6, 7) encontrando similitud entre los genotipos G1, G2 y G3 mediante otros marcadores, en nuestro análisis no podemos inferir dicha similitud entre G1, G2 y G3 ya que no contamos con secuencia de la región ITS 1 para G2 y G3. Asimismo tampoco podemos relacionar nuestros patrones encontrados con G9 por no contar con una secuencia reportada y/o publicada de la región ITS 1 de este genotipo.

Los estudios antes mencionados han permitido determinar la gran variabilidad de genotipos encontrados en los distintos huéspedes y en diferentes áreas del planeta tal como menciona Haag *et al.*, 2004 (25), hecho que avala la relevancia de conocer los genotipos que afectan a nuestra población humana o animal, pues éstos pueden ser diferentes incluso en las diversas áreas geográficas de un mismo territorio.

Finalmente nuestro estudio ha permitido encontrar dos variantes mediante las técnicas de Nested – PCR y RFLP – PCR usando como marcador a la región ITS 1. Aunque una de esta no ha sido identificada a que genotipo pertenece; hemos comprobado la existencia del genotipo G1 presente en mayor frecuencia en los ovinos y bovinos de nuestra sierra central y sur del Perú (Tabla 6), genotipo asociado a infecciones humanas en todo el mundo y cuya diseminación se ve favorecida a través del ciclo doméstico que comprende a los perros y los ovinos, seguido por el ciclo perro – bovino y otros; infección que también podría estar relacionada con las especies de crianza y explotación ganadera tal como ocurre en la serranía de nuestro territorio

Por lo expuesto nuestros resultados pueden contribuir a tomar medidas de importancia epidemiológica y a plantear estrategias posteriores donde el objetivo sea la prevención, tratamiento y control de las infecciones causadas por *E. granulosus* en sus diferentes hospederos.

VII CONCLUSIONES

- En los departamentos de Ayacucho, Cuzco, Pasco y Puno, pertenecientes a la Sierra Central y Sur del Perú existe la presencia del genotipo G1 (Cepa ovina).
- El genotipo G1 presenta una amplia distribución entre las especies de ovinos, bovinos y llamas como hospederos intermediarios.
- Con las secuencias del marcador ITS-1 de nuestros aislados y los reportados en la literatura visualizamos la presencia de 2 variedades de *E. granulosus* en los departamentos de Ayacucho, Cuzco, Pasco y Puno, pertenecientes a la Sierra Central y Sur del Perú, una de las cuales corresponde a G1.

VIII RECOMENDACIONES

- Se debe incentivar las investigaciones en filogenia molecular a fin de detectar la diversidad genética de los parásitos.
- Se sugiere realizar muestreo en diferentes zonas geográficas del país, debido a probable existencia de diferentes cepas adaptadas a diversos nichos ecológicos.
- Se aconseja realizar investigaciones similares de este agente en poblaciones de zonas endémicas con el fin de realizar estudios en epidemiología molecular.
- Se recomienda realizar mayores estudios en diseños de "*primers*" que contribuyan en la detección de mas tipos de *Echinococcus* spp.
- Se invita a evaluar la patogenicidad de cada variante genética encontrada en el Perú, con el propósito de plantear estrategias posteriores, como la elaboración de vacunas como medio efectivo de prevención primaria a la patología producida por *E. granulosus*, que tanto recursos humanos y económicos hace consumir.

IX BIBLIOGRAFIA.

1. Abbasi I., Branzburg A., Campos-Ponce M., Abdel S., Hapez A., Raoul F., Craig P. and Hamburger J. 2003. Copro-diagnosis of *Echinococcus granulosus* infection in dogs by amplification of a newly identified repeated DNA sequence. Am. J. Trop. Hyg. 69 (3): 324 – 330.
2. Ahmadi N. and Dalimi A. 2006. Characterization of *Echinococcus granulosus* isolates from human, sheep and camel in Iran. Infection , Genetics and Evolution. 6 (2): 85–90.
3. Almeida F., Rodrigues-Silva R., Neves R., Romani E. and Machado-Silva J. 2007. Intraespecific variation of *Echinococcus granulosus* in livestock from Peru. Veterinary Parasitology. 147: 50 – 58.
4. Andersen F., Ouhelli H. and Kachani M. 1997. Compendium on cystic echinococcosis: In Africa and in Middle Eastern countries with special referente to Morocco. 1er Ed. Ed. Brigham Young University. USA.
5. Bowles J., Blair D and McManus D. 1992. Genetic variants within the genus identified by mitochondrial DNA sequencing. Molecular and Biochemical Parasitology. 54: 165 – 174.
6. Bowles J. and McManus D. 1993a. Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction based RFLP Method. Molecular Biochem. Parasitoyl. 57: 231-240.
7. Bowles J. and McManus D. 1993b. NADH dehydrogenase 1 gene sequences compared for species and strains of the genus *Echinococcus*. Internacional Journal for Parasitoly. 23: 969 -972.
8. Bowles J. and McManus D. 1993c. Molecular variation in *Echinococcus*, Acta Tropica. 53: 291-305.
9. Carmena D., Benito A, and Eraso E. 2006. Antigens for the immunodiagnosis of *Echinococcus granulosus* infection. Acta Trop. 98(1):74-86.
10. Carmona C., Perdomo R.,Carbo A.,Alvarez C., Monti J., Grauert R., Stern D.,Perera G., Lloyd S., Bazini R., Gemmell M. and Yarzabal L. 1998. Risk factors

associated with human cystic echinococcosis in Florida, Uruguay: results of a mass screening study using ultrasound and serology. *Am. J.Trop. Med.Hyg.* 58: 599-605.

11. Cerrone G., Denninghoff V., Fernández E; Ferrara E., Dalla Fontana L., Jensen O. and Targovnik H. 1997. Best poster prize. Molecular analysis of specific sequences from *Echinococcus granulosus* XVIII International Congress of Hydatidology. Lisbon. *Archivos Internacionales de la EQ.* 32: 281

12. Cerrone G., Fernández E., Ferrara E., Dalla Fontana L., Zanini F., Jensen O. and Targovnik H. 1999. *Echinococcus granulosus* strain situation in Argentina. *Archivos Internacionales de la EQ.* 33: 327

13. Cerrone G. and Targovnik H. 2002. Análisis del genoma de *Echinococcus granulosus*. Su aporte al conocimiento y diagnóstico del parásito, in: Denegri G.M., Elissondo M.C., Dopchiz M.C. (Eds.), *Situación de la EQ - Echinococcosis en la República Argentina*, Editorial Martin, Mar del Plata, Argentina. 41- 48.

14. Dinkel A., Njoroge E., Zimmermann A., Walz M., Zeyhle E., Elmahbi I., Mackemstedt U. and Romig T. 2004. PCR System for detection of species and genotypes of the *Echinococcus granulosus*-complex, with references to the epidemiological situation in eastern Africa. *International Journal for Parasitology.* 34: 645 – 653

15. Dueger E., Verastegui M. and Gilman R. 2003. Evaluation of the enzyme-Linked immunoelectrotransfer blot (EITB) for ovine hydatidosis relative to age and cyst characteristics in naturally infected sheep. *Veterinary Parasitology.* 114: 285 – 293.

16. Eckert J. and Thompson A. 1997. Intraspecific variation of *Echinococcus granulosus* and related species with emphasis on their infectivity to human. *Acta Tropicana.* 64: 19 - 34

17. Eckert J., Gemmel M.A, Meslin F, & Pawlowski Z. 2002. WHO/ OIE Manual on *Echinococcosis* in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern. Paris. World Organisation for Animal Health.

18. Eckert J. and Desplazes P. 2004. Biological, Epidemiological, and Clinical Aspects of Echinococcosis, a Zoonosis of Increasing Concern. *Clinical Microbiology Reviews.* 17(1) 107 – 135

19. Felsenstein, J. 1988. Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annu. Rev. Genet.* 22: 521-565.
20. Gemmell, M. 1968. The Styx Field-Trial. A study on the application of control measures against hydatid disease caused by *Echinococcus granulosus*. *Bulletin of the World Health Organization.* 39:73-100.
21. González L., Daniel-Mwambete K., Montero E., Rosenzvit M., McManus D., Garate T. and Cuesta-Bandera C. 2002. Further molecular discrimination of Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. *Experimental Parasitology.* 102: 46 – 56.
22. Gonzáles L., Muñoz T. y Martínez J. 1997. Evaluación del Sistema de Vigilancia Epidemiológica para Hidatidosis en la provincia de Salamanca. *Boletín Epidemiológico Semanal.* 5 (20): 197 – 204.
23. Gutierrez A. 2003. Cepas de EQ: Implicancias en la Patógena de la Enfermedad. *Jornadas Nacionales de la EQ – 2da jornadas provinciales de EQ- Esperanza, Santa Fe. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNL.*
24. Haag K., Araujo A., Gottstein B. and Zaha A. 1998. Selection, Recombination and History in a Parasitic Flatworm (*Echinococcus*) Inferred from Nucleotide Sequences. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 93(5): 695-702
25. Haag K., Ayala F., Kamenetzky L., Gutierrez A. and Rosenzvit M. 2004. Livestock trade history, geography, and parasite strains: The mitochondrial genetic structure of *Echinococcus granulosus* in Argentina. *Journal parasitology.* 90 (2): 234 – 239.
26. Heath D. and Holcman D. 1997. Vaccination against *Echinococcus* in perspective. *Acta Tropicana.* 67: 37 – 41
27. Irabedra P., Cabrera P y Orlando D. 1999. Algunos campos de investigación epidemiológica prioritarios en la región de las Américas. *Boletín de EQ,Asoc.Int.Hidat.* 16-17.
28. Jenkins D. and Richard M. 1986. Specific antibody responses in dogs experimentally infected with *Echinococcus granulosus*. *The American Society of Tropical Medicine and Higiene.* 35 (2): 345 – 349

29. Kamenetzky L. 2003. Marcadores moleculares para el estudio de cepas de *Echinococcus granulosus*. Jornadas nacionales de EQ – 2da Jornadas provinciales de EQ. Esperanza, Santa fe. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNL.
30. Larrieu E. and Frider B. 2004. Human cystic echinococcosis: Contributions to the natural history of the disease, *Ann. Tropical Medicine of Parasitology*. 7: 679 – 687
31. Lavikainen A., Lehtinen M., Meri T., Hirvela-Koski V and Meri S. 2003. Molecular genetic characterization of the fennoscandian cervid strain, a new genotypic group (G10) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*. 127: 207 – 215.
32. Lavikainen A., Lehtinen M., Laaksonen S., Agren E., Oksanen A and Meri S. 2006. Molecular characterization of *Echinococcus* isolates of cervid origin from Finland and Sweden. *Parasitology*. 133: 565 – 570
33. Le T., Spearson M., Blair D., Dai N., Zhang L and McManus D. 2002. Complete mitochondrial genomes confirm the distinctiveness of the horse – dog and sheep – dog strains of *E. granulosus*. *Parasitology*. 124: 97 – 112.
34. Lewin B. 2004. *Genes VII*. 8va Edition. Pearson. Printice may. New Cork United Status of America .
35. Lightowlers M., Lawrence S., Gauci C., Young C., Ralston M., Mass D. and Heath D. 1996. Vaccination against hdatidosis using a defined recombinated antigen. *Parasite Immunology*. 18: 457 – 462.
36. Lopera L., Moro P., Chavez A., Montes G., Gonzales A. and Gilman R. 2003. Field evaluation of a coproantigen enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of canine echinococcosis in a rural Andean village in Peru. *Veterinary Parasitology*. 117: 37 – 42.
37. Maillard S., Benchikh-Elfegoun M., Knapp J., Bart J., Koskei P., Gottstein B and Piarroux R. 2006. Taxonomic position and geographical distribution of the common sheep G1 and camel G6 strains of *Echinococcus granulosus* in tree African countries. *Parasitol Res*.
38. Malgor R., Nonaka N., Basmadjian I., Sakai H., Carambola B., Oku Y., Carmona C., and Kamiya M. 1997. Coproantigen detection in dogs experimentally and naturally infected with *Echinococcus granulosus* by monoclonal antibody bases ELISA. *Internacional Journal Parasitology*. 27 (12): 1605 – 1612.

39. McManus D. 2002. The molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus* and cysticercosis disease. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1: S151 – 157.
40. McManus D. 2006. Molecular discrimination of taeniid cestodes. Parasitology International. 55: S31 – S37
41. Moks E., Jogisalu I., Saarma U., Talvik H., Jarvis T. And Valdmann H. 2006. Helminthologic survey of the wolf (*canis lupus*) in Estonia, with an emphasis on *Echinococcus granulosus*. Journal of wildlife Disease. 42 (2): 359- 365.
42. Moro P., Guevara A. and Verastegui M. 1994. Distribution of EQ and cysticercosis in different peruvian populations as demonstrated by Enzyme-linked Immuno-electrotransfer blot (EITB) assay. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 51 (6): 851- 855.
43. Moro P., Malqui V., Verastegui M., Gilman, R., Falcón N., Bernal T., Gaviria C., González A., Moro M. and Dueger E. 1997. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay for diagnosis of hydatidosis (*Echinococcus granulosus*) in sheep. The Veterinary Record. 140 (23): 605-606
44. Moro P., Gilman R., and Verastegui M. 1999a. Human EQ in the Central Andes of Perú: Evolution of the Disease over 3 years. Clinical Infectious Diseases. 29: 807 – 812.
45. Moro P., Bonifacio N, Gilman R, Lopera L, Silva B, Takumoto R, Verastegui M, and Cabrera L. 1999b. Field diagnosis of *Echinococcus granulosus* infection among intermediate and definitive hosts in an endemic focus of human cystic echinococcosis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 93: 611 – 615.
46. Moro P., Lopera L., Cabrera L., Cabrera G., Silva B., Gilman R., and Moro M. 2004. Short Report: Endemic focus of cystic echinococcosis in coastal city of Peru. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 71 (3): 327- 329.
47. Mwambete K., Pomce-Gordo F., Cuestas-Bandera C. 2004. Genetic identification and host range of the Spanish strains of *Echinococcus granulosus*. Acta tropicana. 91: 87 - 93

48. Rahimi H., Kia E., Mirhendi S., Talebi A., Fasihi Harandi M., Jalali-zand N. and Rokni M. 2007. A new primer pair in ITS1 Region for molecular studies on *Echinococcus granulosus*. Iranian Journal Public Health. 36 (1): 45 – 49
49. Rosenzvit M., Zhang L., Kamenetzky L., Canova S., Guarnera E. and McManus D. 1999. Genetic variation and epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Argentina. Parasitology. 118:523-530.
50. Sambrook J., Fritsch E. and Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. Second ed.
51. Santivañez S., Gutierrez A., Rosenzvit M., Muzulin P., Rodriguez M., Vasquez C., Rodriguez S., Gonzalez E., Gilman R., and Garcia H. 2008. Human hydatid disease in Peru is basically restricted to *Echinococcus granulosus* genotype G1. Am. J. Trop. Med. Hyg. 79 (1): 89 – 92.
52. Snabel V., D'Amelio S., Mathiopoulos K., Turcekova L. and Dubinsky P. 2000. Molecular evidence for the presence of a G7 genotype of *Echinococcus granulosus* in Slovakia. J. Helminthol. 74: 177 – 181.
53. Taylor, W. 1987. Multiple sequence alignment by a pairwise algorithm. CABIOS. 3: 81-87.
54. Thompson A and McManus D. 2002. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. Trends in Parasitology. 18(10): 452 – 457.
55. Thompson A., Boxell, C., Ralston, J., Constantine C., Hobbs P., Shury T. and Olson E. 2006. Molecular and morphological characterization of *Echinococcus* in cervids from North America. Parasitology. 132 (3): 439-447.
56. Verastegui M., Moro A. and Guevara T. 1992. Enzyme-Linked Immunoassay Test for Diagnosis of Human Hydatid Disease. Journal of Clinical Microbiology. 30 (6): 1551 – 1561.
57. Wachira T., Macpherson C and Gathuma J. 1991. Release and survival of *Echinococcus* eggs in different environments in Turkana and their possible impact on the incidence of hydatidosis in man and livestock. J. Helminthol. 65: 55-61.

58. Wachira T., Bowles E. and McManus D. 1993. Molecular examination of the sympatry and distribution of sheep and camel strains of *Echinococcus granulosus* in Kenya. Am. J. Trop. Med. Hyg. 48: 473-479.
59. Werner A., Perez C., Galdamez E., Campano S., Vega F., Vargas D., Rodriguez J., Retamal C., Cortes P., Zulantay I., and Rycke P. 2000. Equinococosis / EQ en la VII Region de Chile. Rev. Panamerica de Salud Pública. 7 (1): 1 – 16.
60. WHO/ OIE. 2002. Manual on *Echinococcosis* in Humans and Animals: a Public Health Problem of Global Concern. Paris; World Organisation for Animal Health.
61. Xiao N., Qui Jiamin., Nakao M., Li T., Yang W., Chen X., Schantz P., Craig P and Ito A. 2005. *Echinococcus shiquicus* n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. Internacional Journal for Parasitology. 35: 693 – 701.
62. Xiao N., Qui Jiamin., Nakao M., Li T., Yang W., Chen X., Schantz P., Craig P and Ito A. 2006. *Echinococcus shiquicus*, a new species from the Qinghai – Tibet plateau region of China: Discovery and epidemiological implications. Parasitology Internacional. 55: s233 – s236.
63. Zhang L., Chai J., Jiao W ., Osman Y. and McManus D. 1998a. Mitochondrial genomic markers confirm the presence of camel strain (G6 Genotype) of *Echinococcus granulosus* in north wester China. Parasitology. 116: 29 – 33.
64. Zhang L., Eslami A., Hosseini H and McManus D. 1998b. Indication od the presence of two distinct strains of *Echinococcus granulosus* in Iran by mitochondrial DNA markers. Am. J. Tropical Med. Hyg. 59 (1): 171p 174.

X) GLOSARIO

Arbol filogenético. Diagrama de ramificación en forma de árbol que representa las líneas que se han deducido sobre la descendencia.

Cladograma. Diagrama de ramificación que representa la relación entre caracteres o estados de caracteres, a partir de los cuales se pueden hacer inferencias filogenéticas.

Clasificación. 1: proceso de establecimiento, definición y ordenamiento de taxones dentro de series jerárquicas de grupos. 2: Serie jerárquica de grupos o taxones.

Cluster. Grupo taxonómico de cualquier rango, que incluye a todos los grupos subordinados; cualquier grupo de organismos, poblaciones considerados lo suficientemente distintos de otros grupos semejantes como para ser considerados una unidad separada

Código genético. Base bioquímica de la herencia; sucesión de pares de bases nucleotídicas en la cadena de DNA que codifica la información genética; pares de bases nucleotídicas (codon) sucesivos que codifican a un aminoácido simple.

DNA o ADN. Acido desoxirribonucleico; material genético básico de una célula; polímero de los siguientes nucleótidos: adenina, citocina, guanina, timina. Contiene típicamente dos cadenas polinucleotídicas en forma de hélice doble; la sucesión de apareamientos de nucleótidos en las cadenas es la base del código genético.

Electroforesis. Técnica de separación de mezclas de moléculas orgánicas basadas en las distintas velocidades de desplazamientos de las moléculas en un campo eléctrico.

Endémico. Nativo de una región geográfica particular y restringido a ella.

Evolución. 1: Cualquier cambio direccional; desplegado. 2: Cualquier cambio acumulativo en las características de los organismos o poblaciones que se da de generación en generación; descender o desarrollarse con modificación.

Fenotipo. Suma total de las propiedades estructurales y funcionales observables de un organismo.

Filogenia. 1: La historia evolutiva de un grupo o linaje. 2: El origen y la evolución de los taxones superiores.

Gen (gene). Unidad básica de la herencia, comprende una sucesión específica de nucleótidos en la cadena de DNA que desarrolla una función específica y ocupa un lugar específico (locus) en un cromosoma; las formas alternas de un gen se denominan alelos.

Genética. Ciencia encargada de estudiar la estructura, transmisión y expresión de la información hereditaria.

Genoma. Conjunto mínimo de cromosomas no homólogos necesarios para el funcionamiento adecuado de una célula. Conjunto completo de factores hereditarios encerrados en un juego haploide de cromosomas.

Genotipo. Constitución hereditaria o genética de un individuo; todo el material genético contenido en una célula, al que por lo general, se denomina material nuclear.

Nucleótido. Subunidad de las moléculas de DNA y RNA que comprende ácido fosfórico, una base nitrogenada y un azúcar.

Parsimonia (Ley de la). Ley que establece que la hipótesis suficiente más simple debe preferirse, aunque otras sean posibles.

Parsimonia máxima (hipótesis de la). Hipótesis que establece que la reconstrucción óptima de los estados característicos ancestrales es la que requiere el menor número de mutaciones en el árbol filogenético para explicar los estados característicos contemporáneos.

Sistemática molecular. Estudio de los organismos y sus interrelaciones utilizando referencias bioquímicas y empleando técnicas como la electroforesis, hibridación de DNA, microsatélites, secuenciación y RFLPs; estudio de las relaciones evolutivas usando datos moleculares comparativos.

Subespecie. Una determinada raza geográfica; conjunto de poblaciones de la misma especie que comparten uno o mas rasgos distintivos y que ocupan áreas geográficas diferentes de otras subespecies.

Variación. Divergencia de las características estructurales y funcionales dentro de un grupo, en particular de las características que no se atribuyen a diferencias en edad, sexo o etapa de historia de vida.